

Kinetik des Protonen gekoppelten Elektronentransfers in Enzymkomplexen der Atmungskette

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Christian Bamann
aus Tübingen

Frankfurt am Main (2006)
(DF1)

vom Fachbereich 14 der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Fendler

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 08. September 2006

Für Rike
in Liebe und
Dankbarkeit!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Protonen gekoppelter Elektronentransfer	1
1.2. Die Cytochrom c Oxidase	4
1.2.1. Funktion und Struktur	4
1.2.2. Reaktionszyklus und Mechanismus der Protonenpumpe	5
1.2.3. Heterogenitäten der COX	12
1.3. Die Quinol-Fumarat-Reduktase	13
1.3.1. Funktion und Struktur	13
1.3.2. Reaktionsmechanismus der QFR und die Hypothese des E-Weges	14
1.4. Der bc ₁ -Komplex	16
1.4.1. Struktur und Funktion	16
1.4.2. Der Q-Zyklus des bc ₁ -Komplexes	18
1.4.3. Kinetische Messungen am bc ₁ -Komplex	21
1.5. Elektrometrische Untersuchungen zum Protonen gekoppelten Elektronen- transfer	22
2. Material und Methoden	25
2.1. Methoden	25
2.1.1. Herstellung von Proteoliposomen	25
2.1.2. Die Cytochrom c Oxidase	26
2.1.3. Die Quinol-Fumarat Reduktase	26
2.1.4. Der bc ₁ -Komplex	27
2.2. Messmethoden	27
2.2.1. Elektrometrische Messungen	27
2.2.2. Spektrometrische Messungen	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Die Cytochrom c Oxidase	33
3.1.1. Der O→E-Übergang	33
3.1.2. Die Temperaturabhängigkeit des O→E-Übergangs	37
3.1.3. Der P-Zustand	43
3.1.4. Der F-Zustand	46
3.1.5. Variabilität in elektrometrischen Messungen und Heterogenitäten	48
3.1.6. Die N131D-Mutante	53
3.2. Die Quinol-Fumarat Reduktase	58
3.2.1. Synthese eines caged Fumarates	58
3.2.2. Spektroskopische und elektrometrische Messungen an der QFR	63
3.3. Der bc ₁ -Komplex	68

3.3.1. Synthese und Charakterisierung von Ru ₂ Q	68
3.3.2. Synthese von Ru(bpz) ₂ dmbpy und Verknüpfung mit Cytochrom c . .	72
3.3.3. Photooxidation und Photoreduktion des bc ₁ -Komplexes	73
4. Diskussion	83
4.1. Die Cytochrom c Oxidase	83
4.1.1. Die Protonenaufnahme beim O→E-Übergang	83
4.1.2. Die Temperaturabhängigkeit der Elektronen- und der Protonenphase	96
4.1.3. Die Rolle des K-Kanals	103
4.1.4. Modell des katalytischen Zyklus und seine Implikationen	108
4.1.5. Der D-Kanal und die N131D-Mutante	112
4.2. Die Quinol-Fumarat Reduktase	114
4.3. Der bc ₁ -Komplex	115
5. Zusammenfassung	121
Literaturverzeichnis	123
A. Anhang	155
A.1. Synthese des caged Fumarates	155
A.2. Synthese von Ru ₂ Q	156
A.3. Synthese von Ru(bpz) ₂ dmbpy und Ru _{bpz} -H39C-Cc	158

Abbildungsverzeichnis

1.1. Elektronen- und Protonenbewegungen in der Atmungskette	2
1.2. Reaktionsschema für PCET	3
1.3. Struktur der COX aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	6
1.4. Vereinfachter Reaktionszyklus der COX	8
1.5. Vergleich verschiedener Reaktionsmodelle der COX	10
1.6. QFR: Struktur, Reaktionsmechnismus und E-Weg Hypothese	15
1.7. Struktur des bc_1 -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	17
1.8. Der Q-Zyklus des bc_1 -Komplexes	20
2.1. Messaufbau für elektrometrische Messungen	28
2.2. Photooxidation und -reduktion mit Rubpy	30
2.3. Messanordnung an der <i>BLM</i> und deren Ersatzschaltbild	31
3.1. Reduktionsgrad von Häm <i>a</i> unter anaeroben Bedingungen	34
3.2. pH-Abhängigkeit des O→E-Überganges	35
3.3. pH-Inkubation von COV an der <i>BLM</i>	36
3.4. Verschiebung der Soretbande nach pH-Sprung	37
3.5. Temperaturabhängigkeit des O→E-Überganges	39
3.6. Der P _M -Zustand	45
3.7. Elektrometrische Messungen mit COV bei pH 9,2	46
3.8. pH-Abhängigkeit des F-Zustandes	47
3.9. F→O-Übergang	48
3.10. Variabilität in der relativen Amplitude beim O→E-Übergang	49
3.11. Cyanidbindung an COX	50
3.12. Pulsen von COX	51
3.13. FT-IR Differenzspektren nach CO-Photolyse	52
3.14. Lokalisierung der N131D-Mutation	53
3.15. O→E-Übergang der N131D-Mutante	54
3.16. Der E→R-Übergang der N131D-Mutante	55
3.17. Mehrfachblitzexperimente beim E→R-Übergang der N131D-Mutante	55
3.18. Der F→O-Übergang der N131D-Mutante	56
3.19. Elektrogene Reaktionsschritte in QFR	58
3.20. Synthesestrategie für <i>caged</i> Fumarat	59
3.21. Photolysemechanismus von CNB <i>caged</i> Verbindungen	60
3.22. Photolyse von <i>caged</i> Fumarat	61
3.23. Aktivitätstest von QFR mit freigesetztem Fumarat	62
3.24. Redox-Differenzspektren der Hämgruppen der QFR	63
3.25. Transiente Absorptionsmessungen an der QFR mit DMN	64

3.26. Elektrometrische Messungen an der QFR	66
3.27. Fumaratsprung mit Dithionit reduzierter QFR	66
3.28. Protonenwege im bc_1 -Komplex	69
3.29. Synthesestrategie für Ru_2Q	70
3.30. 1H -NMR Spektrum und Elektronenspektrum von Quaterpyridin	71
3.31. Photoreduktion von COX durch Ru_2Q	71
3.32. Synthesestrategie für $Ru(bpz)_2dmbpy$	72
3.33. Ansicht von Ru_{bpz} -H39C-Cc am bc_1 -Komplex	73
3.34. Photooxidation von Ru_{bpz} -H39C-Cc	74
3.35. Reduktion von bc_1 -Komplex durch verschiedene Substrate	75
3.36. Inkubation von Quinolen in einer <i>BLM</i> -Küvette	76
3.37. Photoreduktion von bc_1 -Komplex durch Ru_2Q	78
3.38. Photooxidation des bc_1 -Komplex durch Ru_2Q	79
3.39. Einfluss der DBH_2 -Reduktion auf <i>BLM</i> -Messungen	80
3.40. <i>BLM</i> -Experiment am bc_1 -Komplex mit dem Lampensetup	81
4.1. Vergleich verschiedener Differenzspektren der COX	85
4.2. Berechnete Populationen im O→E-Übergang mit zwei reversiblen Reaktionen	90
4.3. Einfluss einer protonierbaren Gruppe auf die Protonenphase	94
4.4. Marcus-Theorie des Elektronentransfers	97
4.5. Elektronentransferweg von Cu_A nach Häm <i>a</i>	99
4.6. Der K-Kanal im O→E-Übergang	106
4.7. Vergleich des K-Kanals der <i>aa</i> ₃ - und <i>ba</i> ₃ -Oxidase	108
4.8. Reaktionszyklus der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	109
4.9. Synthesevorschlag für ein neues <i>caged</i> Fumarat	115
4.10. Ausgangszustand des bc_1 -Komplex in den elektrometrischen Messungen	117

Tabellenverzeichnis

3.1. Arrhenius-Parameter für den O→E-Übergang	41
3.2. Kinetische Parameter für den O→E-Übergang	42
3.3. Elektrometrische Messungen an der N131D	57
3.4. Zuordnung der Schwingungsbanden von photolysiertem <i>caged</i> Fumarat . . .	61
3.5. Elektrometrische Messungen am <i>bc</i> ₁ -Komplex	80
4.1. Marcus-Parameter für intramolekularen Elektronentransfer	98

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bistris	2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol
BLM	<i>black lipid membrane</i> ; optisch schwarze Lipiddoppelschicht
CNB	α -Carboxynitrobenzyl-Schutzgruppe
CO	Kohlenmonoxid
COV	Proteoliposomen mit Cytochrom <i>c</i> Oxidase
COX	Cytochrom <i>c</i> Oxidase
DBH ₂	reduziertes Decylubiquinol
DECM	7-N,N-Diethyl-4-Methyl-Coumarin
DMNH ₂	reduziertes Dimethylmenaquinol; 2,3-Dimethyl-1,4-Naphthoquinol
E^0 , E'_0	Standardreduktionspotential bei pH 7 und 298 K
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENDOR	<i>electron-nuclear double resonance</i>
EXAFS	<i>extended X-ray absorption fine structure</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
Ferricyanid	K ₃ [Fe(CN) ₆]; Trikalium-hexacyanoferrat(III)
FT-IR	Fourier transformierte Infrarot(spektroskopie)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
MQ/MQH ₂	Menaquinon/Menaquinol, 2-Methyl-3-(Isoprenyl) _n -1,4-Naphthoquinol
MVCO	<i>mixed-valence</i> Enzym mit gebundenem CO
NADH	β -Nicotinamid-Adenindinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
PCET	<i>proton coupled electron transfer</i> , Protonen gekoppelter Elektronen-transfer
PMF	<i>proton motif force</i> , protonenmotorische Kraft
QFR	Quinol-Fumarat-Reduktase
<i>rdla</i>	relative dielectric location of heme <i>a</i>
Ru(bpz) ₂ dmbpy	[Bis-(2,2')-Bipyrazin-(4-Bromomethyl)-(4'-Methyl)-Bipyridin-Ruthenium(II)]-Bishexafluorophosphat
Ru ₂ Q	([Bis-(2,2')-Bipyridyl-(2,2'-4',4''-2'',2''')-Quaterpyridin-Ruthenium(II)]-Tetrahexafluorophosphat
Ru _{bpz} -H39C-Cc	H39C;C102T Cytochrom <i>c</i> , das über H39C mit Ru(bpz) ₂ dmbpy verbunden ist
Rubpy	[Ru ^{II} (2,2'-bipyridyl) ₃]Cl ₂ ; Tris(2,2'-bipyridyl)-ruthenium(II)-dichlorid
SDH	Succinat-Dehydrogenase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UQ/UQH ₂	Ubiquinon/Ubiquinol, 2,3-Dimethoxy-5-Methyl-6-(Isoprenyl) _n -1,4-Benzoquinol

1. Einleitung

1.1. Protonen gekoppelter Elektronentransfer

Energiegewinnung und Energiekonservierung stellen fundamentale Prozesse in biologischen Systemen dar. Die zugrunde liegenden Mechanismen besitzen daher große Bedeutung und sind von besonderem Interesse. Während ATP (Adenosintriphosphat) als Hauptquelle chemischer Energie Zellen mit dieser versorgt, haben verschiedene Lebensformen unterschiedliche Strategien für dessen Produktion entwickelt. In heterotrophen, aeroben Organismen wird der Großteil an ATP in der oxidativen Phosphorylierung erzeugt. Hier werden die Reduktionsäquivalente aus der Substratverwertung wie Glykolyse oder Citratzyklus in mehreren Schritten zur Synthese von ATP umgewandelt. Diese werden von fünf Membrankomplexen katalysiert, die als Atmungskette zusammengefasst werden und in der Cytoplasmamembran oder der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind (Schultz and Chan, 2001).

Die Energie aus der Reduktion des terminalen Elektronenakzeptors Sauerstoff wird in einem elektrochemischen Protonengradienten über der Membran gespeichert, der von der ATP-Synthase für die ATP-Erzeugung genutzt wird (Mitchell, 1979): Dieser Zusammenhang steht im Zentrum der chemiosmotischen Theorie, die damit die Kopplung von Atmung, die den Protonengradienten (*PMF*, *proton motif force*) aufbaut, und der ATP-Synthese durch die F_0F_1 -ATP-Synthase erklärt. Abbildung 1.1 stellt die Architektur der beteiligten Enzymkomplexe einer mitochondrialen Atmungskette sowie den lateralen Elektronenfluss und vektoriellen Protonenfluss dar.

Komplex I, die NADH-Ubiquinon Reduktase, überträgt Elektronen von NADH ($E'_0 = -320\text{ mV}$) auf den mobilen Elektronenträger Ubiquinon ($E'_0 = 90\text{ mV}$) und pumpt dabei in einem noch nicht geklärten Mechanismus $2\text{H}^+/\text{e}^-$ über die Membran (s. Brandt et al., 2003). Die Oxidation von Succinat zu Fumarat ($E'_0 = 30\text{ mV}$) und die Reduktion von Ubiquinon wird von Komplex II (Succinat-Fumarat-Dehydrogenase) katalysiert, einer Reaktion, die nicht mit Protonentransfer über der Membran verbunden ist. Komplex III (Ubiquinol-Cytochrom *c*-Reduktase, bc_1 -Komplex) transferiert die Elektronen von Ubiquinol in einem zweistufigen Mechanismus auf den zweiten mobilen Elektronenträger Cytochrom *c* ($E'_0 = 220\text{ mV}$). Die Arbeitsweise des bc_1 -Komplexes wird durch den Q-Zyklus beschrieben, Protonentransfer über die Membran findet hierbei durch die vektorielle Aufnahme und Abgabe von Protonen bei der Reduktion und Oxidation von Ubiquinol ($\text{UQ} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{UQH}_2$) statt. Im Gegensatz hierzu stellt die Cytochrom *c* Oxidase (COX, Komplex IV) eine indirekte Protonenpumpe dar. Bei der von ihr katalysierten Reaktion werden die Elektronen auf den terminalen Akzeptor Sauerstoff O_2 ($E'_0 = 820\text{ mV}$) für dessen Reduktion zu Wasser übertragen. Zusätzlich zu den für die Wasserbildung benötigten Protonen werden weitere über die Membran aktiv gepumpt ($1\text{H}^+/\text{e}^-$).

Drei der vier Komplexe tragen demnach zur *PMF* bei. Der Rückfluss der Protonen entlang ihres elektrochemischen Gradienten findet im F_0 -Teil der ATP-Synthase (Komplex V) statt, was zur Rotation einer zentralen Untereinheit γ des F_1 -Teiles führt. Dadurch wird

1. Einleitung

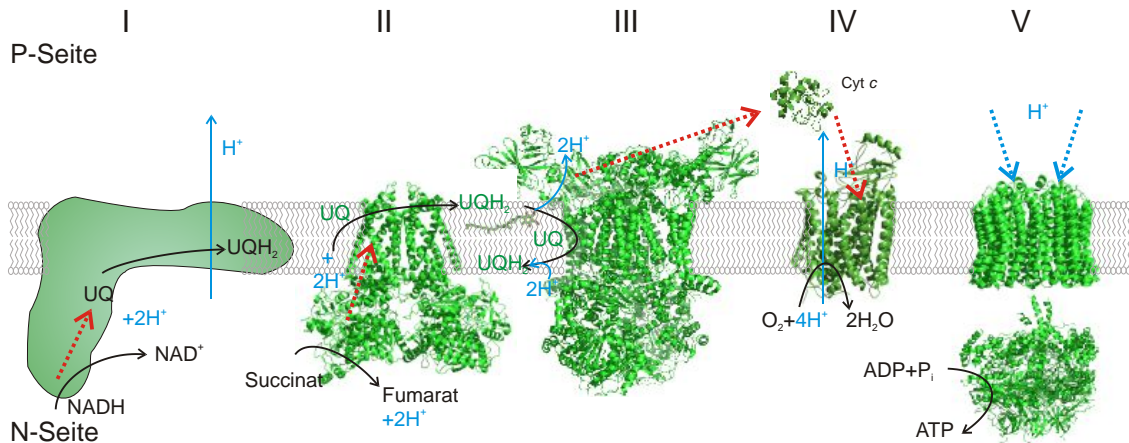


Abbildung 1.1.: Elektronen- und Protonenbewegungen in der Atmungskette: Protonenbewegungen sind in blau dargestellt, der Elektronenfluss durch die vier Komplexe und die beiden mobilen Elektronenträger Cytochrom *c* und Ubiquinon (UQ oxidiert; UQH₂ reduziert) in rot. Protonen werden auf die so genannte P-Seite (**P**ositiv geladen) transportiert, die topographisch mit dem Intermembranraum von Mitochondrien oder dem Periplasma von Bakterien übereinstimmt. Entsprechend beschreibt die N-Seite (**N**egativ geladen) die Matrix von Mitochondrien oder das Cytoplasma von Bakterien.

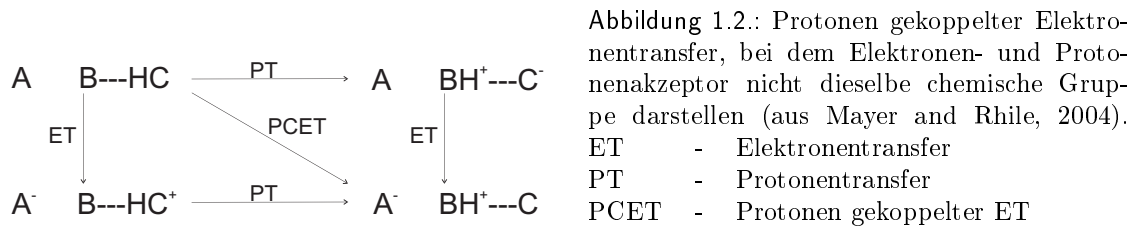
eine enge konformationelle Kopplung mit den katalytischen Zentren der ATP-Synthase ($\Delta G^{0'} = -31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} (\cong 321 \text{ meV})$) und der durch die Protonen angetriebene Rotation vermittelt (s. Oster and Wang, 2003).

Zwar lassen sich alle Vorgänge zum Aufbau der *PMF* als Protonen gekoppelter Elektronentransfer (PCET) bezeichnen, Charakter und Umsetzung in den verschiedenen Enzymkomplexen sind jedoch unterschiedlicher Natur. An allen Redoxreaktionen, die von den ersten vier Komplexen der Atmungskette katalysiert werden, sind als Substrate abseits der transferierten Elektronen auch Protonen beteiligt. Neben der unterschiedlichen Chemie der einzelnen Reaktionen sind hierfür auch die verschiedenen Mechanismen in den Systemen verantwortlich, die den Protonen- und den Elektronentransport miteinander verbinden. Aufgrund der Separierung der Elektronendonoren und -akzeptoren in den Enzymkomplexen wird ein Protonen- und Elektronentransfer über eine große Distanz verlangt. Die beiden Substrate müssen zum Ort der Redoxchemie gebracht werden und darüberhinaus zu den entsprechenden Pumpstellen, die die an die Redoxreaktion gekoppelten Protonen schließlich über die Membran befördern. Für die Funktionalität der Atmungskette bedarf es daher einer besonderen architektonischen Ausstattung: einem effizienten Elektronentransferweg, Protonentransferwegen über große Distanzen und einer engen zeitlichen Kopplung zwischen der Redoxreaktion und den Transferschritten.

Neben der strukturellen und energetischen Dimension besitzen diese Fragestellungen eine kinetische. Die Transferprozesse umfassen transiente Vorgänge, so dass sich deren Beschreibung in einem entsprechenden Formalismus niederschlägt. Elektronentransfer in Proteinen lässt sich mit Hilfe der Marcus-Theorie beschreiben (Gray and Winkler (1996, 2005), s.a. 4.1.2 auf S.96). Hierdurch lässt er sich mit zwei Parametern charakterisieren, der Reorganisationsenergie λ und der elektronischen Kopplung H_{RP} zwischen den beiden Redoxreaktanden. Die Elektronentransferrate im nichtadiabatischen Regime weist in Proteinen eine starke Distanzabhängigkeit auf, die durch das die Redoxkofaktoren umgebende Pro-

teinmedium beeinflusst wird. Sie fällt dabei in einem Maße exponentiell ab, das zwischen dem für ein Vakuum und einer kovalenten Brücke als Medium liegt (Moser et al., 1995). Für Elektronentransfer in biologischen Systemen ergibt sich aus der Distanzabhängigkeit die Forderung, dass in Proteinen die Redoxkofaktoren nicht weiter als 15 Å entfernt sein dürfen.

Der Protonentransfer über große Distanzen stellt hierzu ein konzeptionell anderes Problem dar. Protonen können aufgrund ihrer gegenüber Elektronen fast 2000 Mal größeren Masse nicht über längere Distanzen durch die Proteinumgebung tunneln (≤ 1 Å). Für einen Transfer über die Membran, der also die beiden wässrigen Phasen miteinander verbindet und sich über ≈ 30 Å erstreckt, muss demnach ein anderer Mechanismus greifen (Ferguson, 2000). Prinzipiell stellt ein Protonentransfer eine Serie von Säure-Base-Reaktionen dar, bei denen neben den Aminosäureresten mit protischen Gruppen auch Wassermoleküle, in Proteinen gebunden, beteiligt sein können (Williams, 2002). Die Protonentransferrate wird durch die pK_s -Werte der einzelnen Gruppen beeinflusst. Diese sind allerdings in den meisten Fällen für die beteiligten Gruppen unbekannt, da sie sich im Inneren des Proteins mit einer kleinen Dielektrizitätskonstante von wässrigen Systemen unterscheiden können. Selbst ein Transfer über kurze Entfernung gewinnt in der Beschreibung der daran beteiligten Gruppen schnell ein hohes Maß an Komplexität. Neben der Protonenübertragung in Proteinen kann auch der Übertritt eines Protons von der wässrigen Phase in den Protonenkanal des Proteins (Gutman and Nachliel, 1990) oder zwischen der geladenen Membranoberfläche und der wässrigen Phase eine beträchtliche Barriere darstellen, die die Kinetik des Protonentransfers beeinflusst und bei der Beschreibung des Protonentransfers unter Umständen berücksichtigt werden muss (Cherepanov et al., 2003; Mulkidjanian et al., 2006).



Die Kopplung von Elektronen- und Protonentransfer ist ein wesentlicher Bestandteil der chemiosmotischen Theorie: Die Energie aus der Oxidation der Reduktionsäquivalente muss zum Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten genutzt werden. Der thermodynamische Zyklus in Abbildung 1.2 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen diesen beiden Reaktionen, wobei die Reaktanden des Elektronentransfers hier nicht mit denen der Protonierungsreaktion zusammenfallen. Bei gekoppelten Reaktionen beeinflussen sich die pK_s -Werte und die Redoxpotentiale der beteiligten Gruppen derart, dass die höher oxidierte Form zu einer Erniedrigung des pK_s -Wertes führt und umgekehrt. Die Reaktionen können dabei entweder sequentiell oder konzertiert verlaufen. Die Wahl des Reaktionsweges wird hierbei von der Höhe und der Art der Barriere bestimmt. Sind die beiden Reaktionen voneinander getrennt (Auftreten eines Intermediates), lassen sie sich einzeln mit den entsprechenden kinetischen Formalismen betrachten. Andererseits kann der konzertierte Schritt zu einer beträchtlichen Absenkung der Energiebarriere führen und somit den bevorzugten Reaktionsweg darstellen. Ein Beispiel stellt der Transfer eines Wasserstoffatoms vom Wasser oxidierenden Mangan-Cluster auf das Redox-aktive Tyrosinradikal Y_z in Pho-

1. Einleitung

tosystem II dar (Tommos and Babcock, 1998; Westphal et al., 2000). Detaillierte kinetische Studien konnten hier belegen, dass die Reaktion am besten mit einer konzertierten Übertragung eines Wasserstoffatoms beschrieben wird.

Protonen gekoppelter Elektronentransfer ist theoretisch untersucht worden. Der gemeinsame Transfer auf einer Reaktionskoordinate erscheint zunächst sehr unwahrscheinlich aufgrund der unterschiedlichen Massen. Aus der Entwicklung der Elektronentransferraten wird ersichtlich (Hatcher et al., 2005; Hammes-Schiffer, 2002), dass das Proton sowohl die elektronische Kopplung als auch die Reorganisationsenergie des Prozesses beeinflusst (Cukier and Nocera, 1998; Hammes-Schiffer, 2001). Die Kopplung der Ladungsverschiebung durch die Elektronen- und Protonenbewegung an die Polarisierung des umgebenden Mediums ist ein entscheidendes Charakteristikum von PCET (Chang et al., 2004). Die Unterscheidung der einzelnen Prozesse ist nicht vorhersagbar, sondern liegt an den spezifischen energetischen Gegebenheiten. In welchem Umfang PCET in den verschiedenen Reaktionen der Atmungskette auftritt, ist bisher noch ungeklärt (Cukier, 2004). Es stellt jedoch einen attraktiven Ansatz dar, der letztlich die Kinetik des PCET erklären und somit in solchen Messungen nachgewiesen werden kann. Kinetische Untersuchungen, wie Aktivierungsenergien oder kinetische Isotopeneffekte, können demnach verstehen helfen, wie die Natur die Kopplung in den verschiedenen Enzymkomplexen umgesetzt hat.

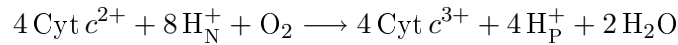
1.2. Die Cytochrom *c* Oxidase

Über verschiedene Aspekte der Cytochrom *c* Oxidase stehen eine Vielzahl an Übersichtsartikeln zur Verfügung, die hier nur angeführt werden sollen, um als eine erste Referenz zu dienen. Wesentliche Details der frühen biochemischen Charakterisierung sind in Wikström et al. (1981) zusammengefasst. Auf weitere allgemeine Artikel (Babcock and Wikström, 1992; Ferguson-Miller, 1996; Michel et al., 1998; Kannt and Michel, 2001; Ludwig et al., 2001; Richter and Ludwig, 2003; Brzezinski, 2004), sowie über Untersuchungen zur Sauerstoffchemie der COX (Kitagawa, 1997; Einarsdóttir and Szundi, 2004) und synthetischen Modellsystemen des binuklearen Zentrums (Kim et al., 2004; Collman et al., 2004) soll hier hingewiesen werden, die letztlich auf die zentrale Frage des molekularen Pumpmechanismus hinführen (Zaslavsky and Gennis, 2000; Mills and Ferguson-Miller, 2003; Wikström, 2004), ohne den Anspruch der Vollständigkeit zu erfüllen.

1.2.1. Funktion und Struktur

Das Gram-negative Bakterium *Paracoccus denitrificans* besitzt als Modellsystem alle Komponenten einer mitochondrialen Atmungskette (John and Whatley, 1977). Drei verschiedene terminale Oxidasen können in Abhängigkeit der Sauerstoffumgebung exprimiert werden (de Gier et al., 1994), wobei im Folgenden nur die *aa₃*-Oxidase (COX) betrachtet wird. Die isolierte COX (Ludwig and Schatz, 1980) aus *Paracoccus denitrificans* besteht aus vier Untereinheiten. Untereinheit I und II binden die Redox-aktiven metallischen Kofaktoren und bilden die funktionale Einheit. Eine Rolle von Untereinheit III auf die Stabilität und Aktivität wurde beobachtet (Hosler, 2004) und ist Gegenstand einer Diskussion über die Bedeutung dieser Untereinheit (Mills and Hosler, 2005). Neben den am Elektronentransfer beteiligten Metallzentren finden sich noch ein Magnesium oder Mangan-Ion zwischen Untereinheit I und II, sowie eine Calciumbindungsstelle in der Nähe von Häm *a* (Pfitzner

et al., 1999). Vier Elektronen von Cytochrom *c* werden auf den terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen, der in einer Reihe von Reaktionen zu Wasser reduziert wird. Die dabei freigesetzte Energie ($\approx 2,3 \text{ eV}$) kann für das Pumpen von vier Protonen über die Membran dienen:



Sowohl die gepumpten als auch die für die Wasserbildung benötigten chemischen Protonen werden von der N-Seite aufgenommen, während die Elektronen von der P-Seite angeliefert werden. So werden in einem Reaktionszyklus insgesamt acht Ladungen, vier gepumpte Protonen und je vier Elektronen und Protonen für die Wasserbildung, über die Membran verschoben, was bei einer *PMF* von $0,22 \text{ V}$, ein Wert, der in Mitochondrien gefunden wird, einem Wirkungsgrad von $\approx 75\%$ entspricht.

Inzwischen sind eine ganze Reihe von Röntgenstrukturen von unterschiedlichen Oxidasen aus verschiedenen Organismen verfügbar, die 4-Untereinheiten-Struktur aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995, s. Abb. 1.3), aus dem Rinderherz (Tsukihara et al., 1996, 2003), aus *Rhodobacter sphaeroides* (Svensson-Ek et al., 2002), sowie die *ba*₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* (Soulimane et al., 2000) und die *bo*₃-Ubiquinol-Oxidase aus *Escherichia coli* (Abramson et al., 2000). In Kombination mit Mutagenese-Studien konnten zwei Hauptprotonenwege identifiziert werden (Pfitzner et al., 1998; Gennis, 1998), die nach konservierten Aminosäuren benannt sind, D124 im D-Kanal und K354 im K-Kanal. Sie besitzen eine Reihe von hydrophilen und protischen Seitenketten, die in Zusammenarbeit mit gebundenen Wassermolekülen für einen effizienten und schnellen Protonentransport sorgen. Im D-Kanal ist das Glutamat E278 lokalisiert. Es wird angenommen, dass Protonen von dieser Stelle aus zum einen ins binukleare Zentrum, zum anderen zu einer Pumpstelle aus einem Cluster aus ionisierbaren Gruppen und Wassermolekülen *via* den Hämproportionaten gelangen können (Kannt et al., 1998a). Von hier können die Protonen entlang eines Protonenausgangskanals zur periplasmatischen Seite transportiert werden. Aus theoretischen (Popović and Stuchebrukhov, 2005) und experimentellen Ergebnissen (Schmidt et al., 2003) wurde geschlossen, dass der Bereich um die Mg/Mn-Bindungsstelle an diesem Prozess beteiligt ist. Elektronentransfer wird hingegen von der gegenüber liegenden Seite initiiert. Das binukleare Cu_A stellt den primären Elektronenakzeptor für Cytochrom *c* dar (Pan et al., 1993). Von hier aus gelangen die Elektronen über das *low spin* Häm *a*₃ ins binukleare Zentrum, das aus dem *high spin* Häm *a*₃ und Cu_B besteht, dem Ort der Sauerstoffreduktion.

1.2.2. Reaktionszyklus und Mechanismus der Protonenpumpe

Die Sauerstoffchemie ist mit verschiedenen spektroskopischen und analytischen Methoden untersucht worden. Hinsichtlich der detektierbaren Intermediate und der Oxidationszustände der Sauerstoffintermediate besteht Einvernehmen, bezüglich der Protonierungsgrade hingegen sind verschiedene Modelle zu finden. Abbildung 1.4 zeigt einen vereinfachten Zyklus der COX mit ihren verschiedenen Zwischenzuständen. Das isolierte Enzym liegt im oxidierten Zustand vor (**O**, *oxidized*). In der Kristallstruktur des Enzyms aus *Paracoccus denitrificans* wurde die Elektronendichte zwischen Häm *a*₃ und Cu_B als ein Wasserligand am Häm und ein Hydroxidion als vierter Ligand am Kupferatom modelliert (Ostermeier et al., 1997). Dies ist in Übereinstimmung mit EXAFS-Messungen (*extended X-ray absorption*

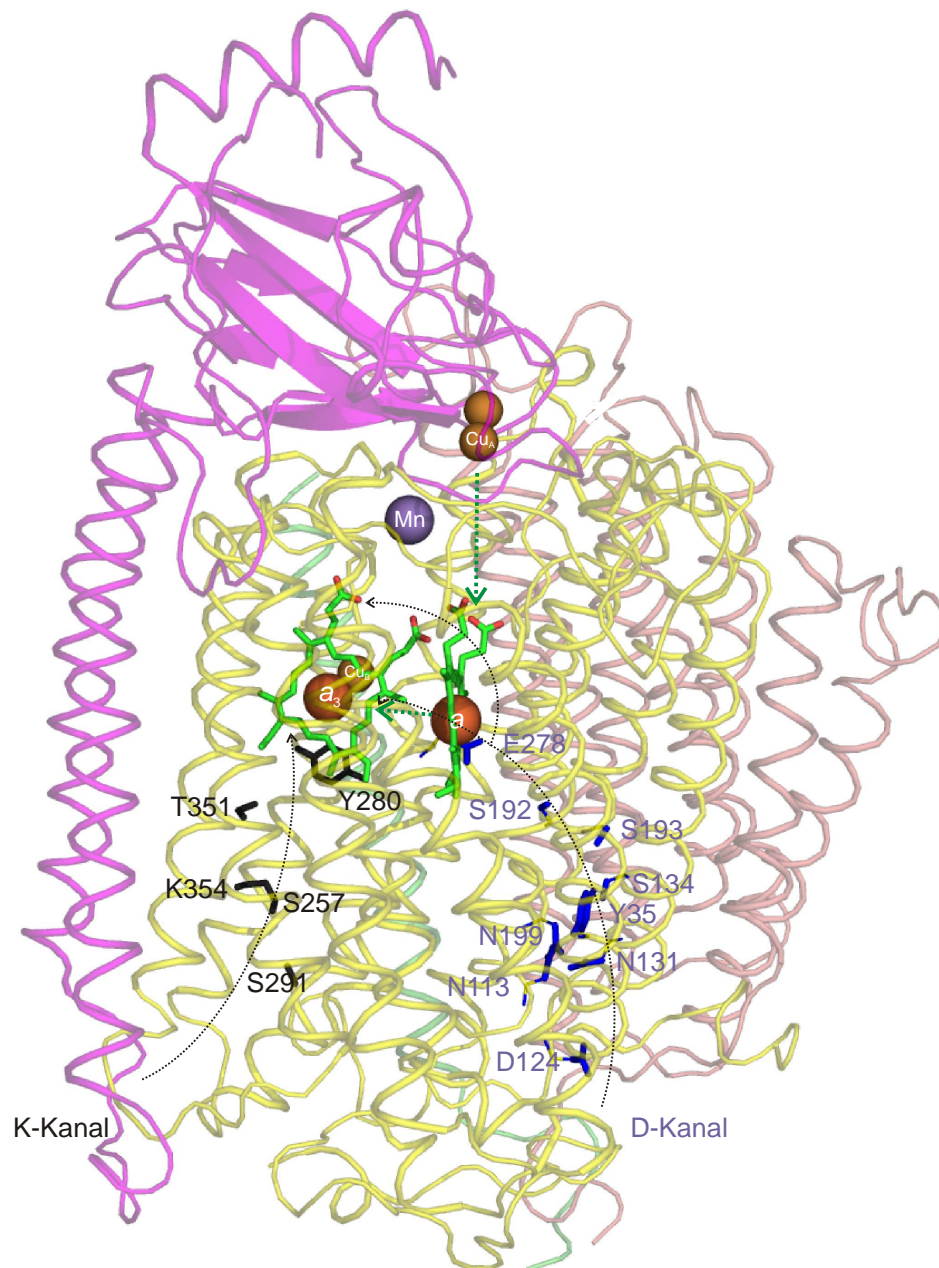


Abbildung 1.3.: Struktur der vier Untereinheiten der Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* (PDB Code 1QLE): Die einzelnen Untereinheiten sind unterschiedlich farblich markiert (UE I gelb, UE II lila, UE III orange, UE IV grün). Die beiden Protonenkanäle führen über eine Reihe von angezeigten Aminosäureseitenketten von der cytoplasmatischen Seite ins Innere des Proteins. Elektronentransfer (grüne Pfeile) ins binukleare Zentrum startet beim primären Elektronenakzeptor Cu_A und führt weiter über Häm *a* zu Häm a_3 . Die metallischen Kofaktoren sind entsprechend benannt.

fine structure), die ein Sauerstoffatom als vierten Liganden des Cu_B in einer tetragonalen Koordination zusammen mit drei Histidinliganden (H276, H325, H326) unterstützen (Powers et al., 1994). Die so genannte reduktive Phase des katalytischen Zyklus umfasst die ersten beiden Elektronenaufnahmen, da diese in Abwesenheit von Sauerstoff stattfinden und nur zur Reduktion der metallischen Redoxkomponenten der COX führen. Nach Aufnahme des ersten Elektrons befindet sich das Enzym im E-Zustand (**E**, *electronated*), nach der zweiten im R-Zustand (**R**, *reduced*). Das reduzierte Häm a_3 bindet molekularen Sauerstoff (**A**, Chance et al., 1975). Die Sauerstoffbindung zwischen den beiden Sauerstoffatomen wird daraufhin in einer konzertierten Reaktion ohne detektierbare Intermediate gebrochen, und das Enzym gelangt in den P_M -Zustand (**P**, *peroxy*). Aus Isotopenmarkierungen des Sauerstoffs wurde deutlich, dass bereits in diesem Zustand das Eisenatom des Häm a_3 im Ferrylzustand vorliegt und nicht, wie zuvor angenommen, als ein Peroxyaddukt (Proshlyakov et al., 1998; Fabian et al., 1999). Von den vier Elektronen, die zur Reduktion des Sauerstoffs in diesem Schritt benötigt werden, stammen drei von den Metallzentren und das vierte von einer aromatischen Aminosäure, die hierbei zu einem Radikal konvertiert. Deren Identität ist noch nicht vollständig geklärt, da das primäre Radikal mit weiteren Seitenketten reagieren kann, was die Zuordnung in den EPR-Spektren erheblich erschwert (Budiman et al., 2004). Dennoch gibt es Hinweise, dass das konservierte W272 die ursprüngliche Elektronenquelle für die Sauerstoffreduktion darstellt (MacMillan et al., 2006). Das nächste Intermediat im Zyklus wird nach dem Ferrylzustand benannt (**F**, Proshlyakov et al., 1996)) und unterscheidet sich vom vorherigen in der Abwesenheit eines Radikalsignals in den EPR-Spektren, so dass im $\text{P} \rightarrow \text{F}$ -Übergang das Radikal als Spezies mit der größten Oxidationsstärke rereduziert wird. Das vierte Elektron bringt das Eisenion von Häm a_3 wieder auf die Oxidationsstufe Fe^{III} und stellt damit den Ausgangszustand wieder her.

Neben den hier vorgestellten Intermediaten werden in der Literatur noch weitere erwähnt. An der Cytochrom *c* Oxidase können zeitaufgelöste Messungen mit der so genannten *flow-flash* Technik durchgeführt werden. Hierbei wird ausgenutzt, dass Kohlenmonoxid (CO) an das reduzierte Häm a_3 binden und durch Licht wieder freigesetzt werden kann. Wird die Reaktionslösung vor der Photolyse mit einer sauerstoffhaltigen Lösung gemischt (*flow*) und kurz darauf das CO photolysiert (*flash*), können die durch die Sauerstoffchemie induzierten Signale zeitlich verfolgt werden. Als Ausgangszustand solcher Messungen kann das vollständig reduzierte, CO bindende Enzym (**RedCO**) oder ein Enzym dienen, bei dem nur das binukleare Zentrum reduziert und mit CO gebunden vorliegt (*mixed-valence CO bound*, **MVCO**). Ausgehend von RedCO führt die Reaktion mit Sauerstoff zu einer Spezies, die ein ähnliches Absorptionsspektrum wie P_M im sichtbaren Bereich mit einem Peak bei 607 nm für das Rinderherzenzym aufweist und daher **P_R** genannt wird. Sie besitzt ein zusätzliches Elektron zwischen Häm *a* und Cu_A und ein rereduziertes Radikal. Die beiden Formen P_R und P_M unterscheiden sich jedoch auch spektroskopisch im sichtbaren Bereich (Einarsdóttir et al., 2002), was entweder eine Konsequenz aus der Anwesenheit eines Radikals in der P_M -Form ist oder das Ergebnis unterschiedlicher Reaktionswege, die abhängig vom pH-Wert beschriftet werden (Szundi et al., 2003). Ein vergleichbarer Effekt kann auch auf der Stufe der Zweielektronen reduzierten Spezies beobachtet werden. In Abhängigkeit vom pH-Wert findet man bei der Reaktion von COX mit H_2O_2 eine Mischung von P_M und einer weiteren Spezies **F'**, die ein ähnliches Absorptionsspektrum wie der F-Zustand mit einem Peak bei 580 nm aufweist, zusätzlich jedoch ebenfalls wie P_M über ein Radikal verfügt (MacMillan et al., 1999). Die Präsenz weiterer Zustände sowie die Aufzweigung der

1. Einleitung

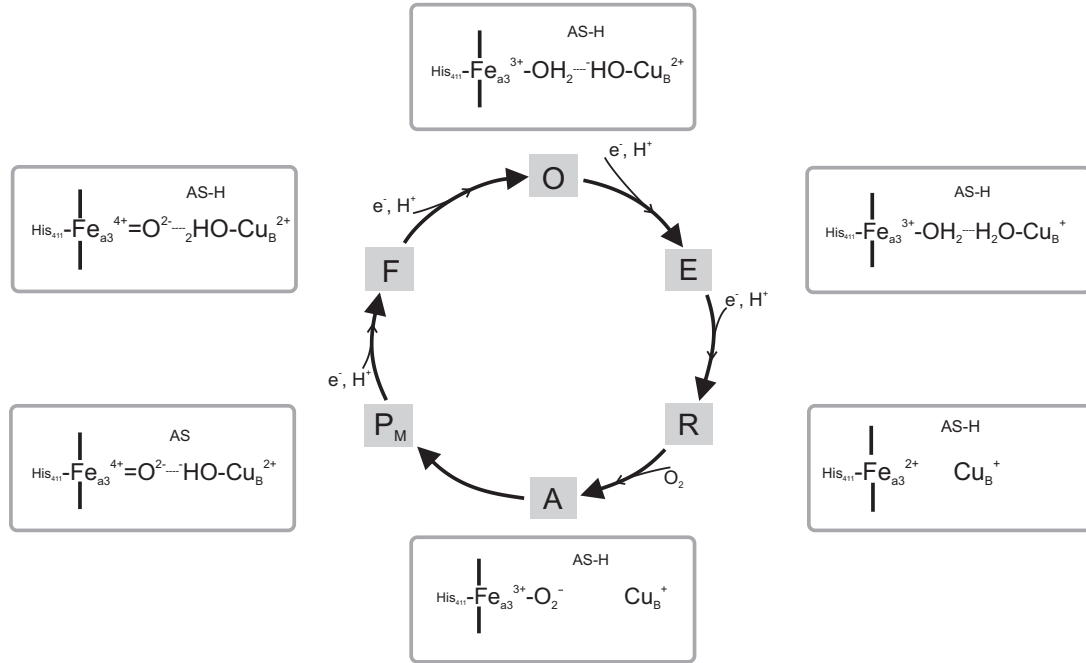


Abbildung 1.4.: Vereinfachter Reaktionszyklus der COX: Dargestellt ist der Reaktionszyklus der COX, dessen Intermediate mit den gewohnten Buchstaben benannt sind. Daneben sind die möglichen chemischen Zustände des binuklearen Zentrums abgebildet. AS-H steht für eine Aminosäure, die als Elektronendonator in der Bildung des P_M-Zustandes fungiert. Der zweite Protonenakzeptor in der reduktiven Phase ist nicht dargestellt. Er fungiert hier als zusätzlicher Protonendonator im P→F-Übergang.

Reaktionswege kann in der physiologischen Reaktion der COX zu einer Erweiterung des Reaktionszyklus' führen.

Bezüglich des Reaktionsmechanismus' hat das wissenschaftliche Feld der Oxidase in den letzten Jahren viele neue Vorstellungen entwickelt. So wurde das Modell überholt, dass nur im P→F-Übergang und im F→O-Übergang je zwei Protonen gepumpt werden (Wikström, 1989). Dagegen ist die elektrostatische Kompensation im Inneren des Proteins als Konzept der Elektroneutralität akzeptiert, das eine Aufnahme einer Gegenladung bei Transfer einer Ladung in die COX verlangt (Rich, 1995). Für den Mechanismus der Cytochrom *c* Oxidase entwickelt sich nun die Problematik, dass pro Elektron insgesamt zwei Ladungen über die Membran verschoben werden. Von einer abstrakten, vereinfachenden Warte betrachtet, lässt sie sich lösen, indem Elektronentransfer von Cytochrom *c* nach Häm *a* oder ins binukleare Zentrum mit der Beladung der Pumpstelle im Inneren der COX mit einem Proton verknüpft ist. Der Elektronentransfer generiert eine reduzierte Gruppe mit hohem pK_s-Wert, deren Protonierung durch ein zweites Proton das zu pumpende Proton auf die P-Seite aufgrund der ungünstigen elektrostatischen Wechselwirkung ausstößt. Hinsichtlich der an diesem Vorgang beteiligten Gruppen und der zugrunde liegenden Prinzipien herrscht jedoch Uneinigkeit.

Michel (1998, 1999) erweiterte das Prinzip der Elektroneutralität auf die Reduktion von Häm *a*. Die Aufnahme eines Elektrons wird durch eine Protonenaufnahme kompensiert.

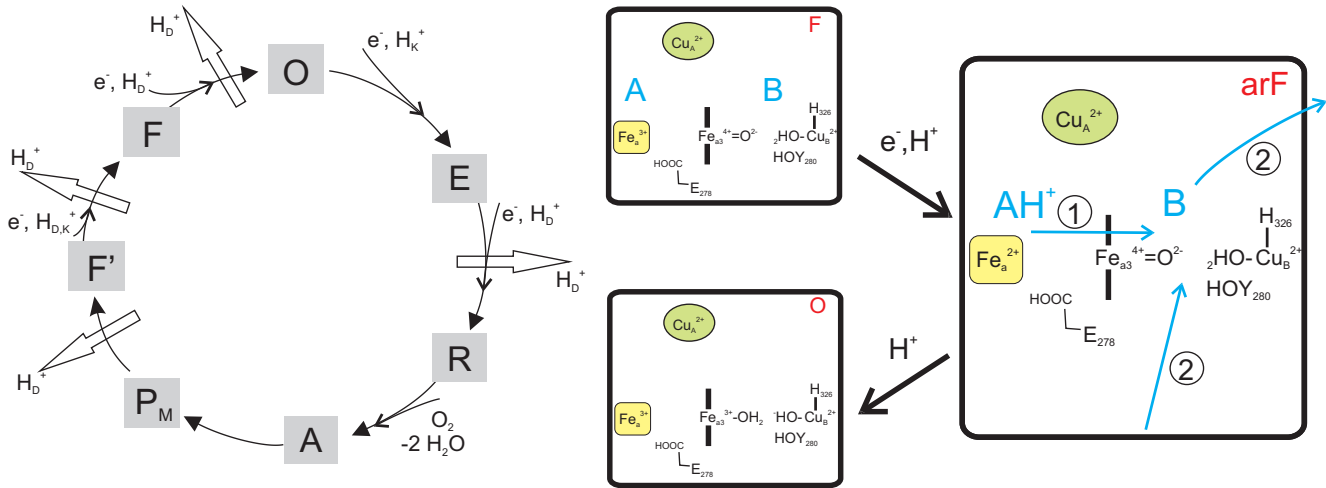
Die in elektrostatischen Rechnungen gefundenen Cluster (Kannt et al., 1998a) dienen als Protonierungsstellen für das zu pumpende Proton und werden von dem Reduktionszustand von Häm *a* beeinflusst: So führt Elektronentransfer von Häm *a* nach Häm *a*₃ zu einem Protonentransfer von Cluster A nach Cluster B. Von dieser Stelle besitzt das Proton keinen Zugang zum binuklearen Zentrum, was zu einer Kurzschlussreaktion führte. Die Reduktion des binuklearen Zentrums kreiert ein Zwischenprodukt, dessen Protonierung nun das Proton im Cluster B ausstößt, so dass es auf die N-Seite freigesetzt wird (s.a. Abb. 1.5(a)).

Papa (2005) beschreibt einen ähnlichen Mechanismus, den er allosterische, kooperative Kopplung in Anlehnung an Hämoglobin nennt. Hier sind die Kofaktoren Cu_A/Häm *a* und Cu_B/Häm *a*₃ mit der Aufnahme bei Reduktion und Abgabe bei Oxidation von Redox-Bohr-Protonen verknüpft, die ebenfalls in zwei Clustern aufgenommen werden. Der wichtige Unterschied liegt in der allosterischen Kontrolle, die die Vektorialität der Protonenbewegung vermittelt: Aufgrund der beobachteten Strukturänderungen, die in den Kristallstrukturen der oxidierten und reduzierten Rinderherzoxidase beobachtet wurden (Tsukihara et al., 2003), wurde auf eine besondere Rolle von D51 geschlossen, das bei Reduktion von Häm *a* zur wässrigen Phase der P-Seite zugänglich wird und deprotoniert. Im deprotonierten Zustand wird nun bei Rückkehr des D51 das oxidierte Häm *a* stabilisiert. Auslöser ist in Analogie zu Hämoglobin eine kleine Änderung am Histidinliganden des Häm *a*, das sich in einer konformationellen Welle fortsetzt. Die Abwesenheit von D51 in bakteriellen Oxidasen sowie von großen strukturellen Änderungen nach Reduktion (Harrenga and Michel, 1999) unterminiert die Allgemeingültigkeit dieses Modells.

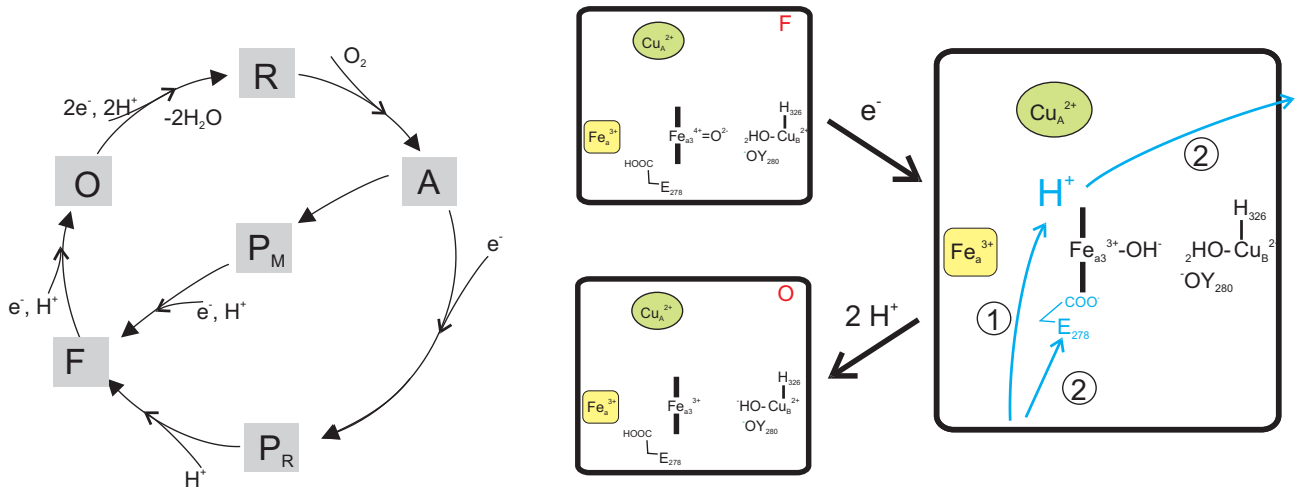
Namslauer et al. (2003); Namslauer and Brzezinski (2004) stellen den elektrostatischen Modellen ein mechanisches gegenüber: Der Pumpvorgang wird hier nicht durch Elektronentransfer, sondern durch Protonierung des binuklearen Zentrums durch E286 (E278 in *Paracoccus denitrificans*) initiiert. Dadurch wird eine transiente strukturelle Veränderung in der Pumpstelle, den Hämpropionaten, hervorgerufen, die nun von der cytoplasmatischen Seite protoniert werden können. Reprotonierung von E286 und Relaxation der Strukturänderung führen zur pK_s-Erniedrigung der Pumpstelle und Freisetzung des gepumpten Protons auf der periplasmatischen Seite (s.a. Abb. 1.5(b)). Die Energie, die für das Pumpen eines Protons über die Membran notwendig ist, wird hier also in einem energetisierten Zustand des Proteins gespeichert und mechanistisch ohne Elektronentransfer vermittelt (Faxén et al., 2005). Dieser grundlegende Unterschied ist jedoch angezweifelt worden (Belevich et al., 2006).

Wikström (2004) betont ebenfalls die Bedeutung des Substratprotons, um das zu pumpende Proton elektrostatisch aus der Pumpstelle auszustoßen. Der Zugang der Pumpstelle zu den beiden wässrigen Phasen der Membran wird hier kinetisch kontrolliert: Protonierung der Pumpstelle ist nur transient möglich und von der cytoplasmatischen Seite schneller als von der periplasmatischen. Das Substratproton ist an vorherigen Elektronentransfer geknüpft, so dass Kurzschlussreaktionen, d.h. Protonierung der Pumpstelle von der periplasmatischen Seite nur bei einer sehr hohen *PMF* stattfindet. Da sowohl Substrat- als auch Pumpprotonen über den D-Kanal aufgenommen werden, erfordert dieses Modell ein Takten der Zugänglichkeit. Hierfür wurde eine Kontrolle des elektrischen Feldes zwischen den Hämgruppen über die Ausbildung von Wasserketten vorgeschlagen, die bei Reduktion von

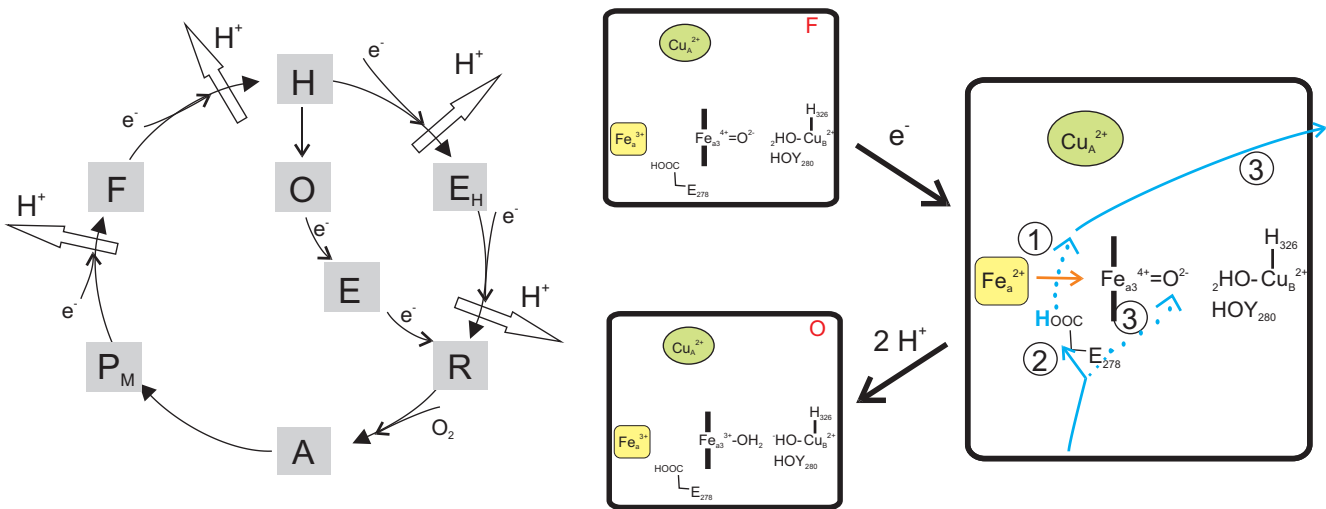
1. Einleitung



(a) Modell nach Michel



(b) Modell nach Brzezinski



(c) Modell nach Wikström

Häm *a* Zugang von E278 zur Pumpstelle, sowie nach Oxidation zum binuklearen Zentrum gewährleistet (Wikström et al., 2003, 2005; Olsson and Warshel, 2006). Im Unterschied zu den elektrostatischen Modellen ist hierfür eine Kopplung zwischen Häm *a*-Reduktion und Protonenaufnahme nicht notwendig, hingegen muss jeder Übergang mit Elektronentransfer zum Pumpen eines Protons führen. Hierfür muss eine neue Spezies **H** statt des O-Zustandes eingeführt werden, deren Protonierung auch in der reduktiven Phase ausreichend ist, um je ein Proton im O→E-Übergang und E→R-Übergang zu pumpen (Verkhovsky et al., 1999b; Bloch et al., 2004). Bisher fehlen jedoch spektroskopische Hinweise auf die Anwesenheit einer solchen Spezies. H ist nicht stabil und relaxiert in den O-Zustand, dessen Reduktion zu R nicht mit Protonenpumpen verbunden ist (s. Abb. 1.5(c)).

Popović and Stuchebrukhov (2004b) schlagen ein ähnliches Modell vor, bei dem der Pumpvorgang einer kinetischen Kontrolle untersteht. Bei Reduktion des binuklearen Zentrums wird H291 (H326 in *Paracoccus denitrificans*), ein Ligand von Cu_B, protoniert. Die anschließende Aufnahme des Substratprotons führt zur Freisetzung des gepumpten Protons. Die kinetische Kontrolle liegt in der Tatsache, dass H291 schneller protoniert wird als der Akzeptor im binuklearen Zentrum. Dieses Modell ist dem von Michel (1999) sehr ähnlich, betont aber die Rolle von H291, das zuvor schon eine zentrale Rolle im Histidinzyklus gespielt hat (Wikström, 2000). Es unterstreicht darüber hinaus die immer stärker werdende Rolle und fortschreitende Entwicklung in der Anwendung Computer gestützter Analysen (elektrostatische Berechnungen, MolekularDynamische/QuantenMechanische Berechnungen), zum einen hinsichtlich der elektrostatischen Wechselwirkungen und zum anderen in Bezug auf die Reaktionswege.

Abbildung 1.5 vergleicht drei verschiedene Modelle und soll exemplarisch anhand des F→O-Überganges die mechanistischen Unterschiede beleuchten. Insbesondere die Rolle von Häm *a* und seine Verknüpfung mit Redox-Bohr-Protonen, sowie der Mechanismus der Kopplung von Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen und dem Protonentransfer zur Pumpstelle bleiben weiterhin Gegenstand intensiver Forschung und Diskussionen. Das Modell nach Michel ist in Abbildung 1.5(a) dargestellt. Im F→O-Übergang führt Reduktion von Häm *a* zur Protonierung des Cluster A (Zwischenstufe arF). Elektronentransfer von Häm *a* nach Häm *a*₃ führt zur Verlagerung des Protons vom Cluster A nach Cluster B (1). Protonierung des binuklearen Zentrums stößt das zu pumpende Proton aus dem Cluster B (2).

In Abbildung 1.5(b) ist das Modell nach Brzezinski and Larsson (2003) dargestellt: Im Zyklus ist ausgehend von **A** auch die Intermediate aus der Reaktion mit dem vollständig reduzierten Enzym zu sehen (**P_R**), da hier der Protonentransfer in Abwesenheit von Elektronenbewegungen zu beobachten ist (**P_R** → F-Übergang). Im F→O-Übergang führt Elektronentransfer ins binukleare Zentrum zur Deprotonierung von E278 und dem transienten Öffnen des Protonenweges zur Pumpstelle (1). Reprotonierung von E278 setzt das gepumpte Proton frei (2).

Im Modell nach Wikström (2004) spielt die Oxidation von Häm *a* eine zentrale Rolle (Abbildung 1.5(c)): Reduktion von Häm *a* führt zur Orientierung einer Wasserkette zwischen E278 und den Hämpropionaten (blaue Kreise). Durch Elektronentransfer auf Häm *a*₃ (oranger Pfeil) kommt es zur transienten Deprotonierung von E278 und Transfer dieses Protons zur Pumpstelle (1) und zur Reprotonierung von E278 (2). Die Wasserkette

1. Einleitung

erfährt eine Umorientierung, Protonentransfer ins binukleare Zentrum wird möglich und das zu pumpende Proton wird aufgrund der Elektrostatik freigesetzt (3).

1.2.3. Heterogenitäten der COX

In der Literatur wurden schon ausführlich für das Rinderherzenzym Heterogenitäten bei verschiedenen Enzympräparationen beschrieben (s. Moody, 1996, für eine Übersicht). Für die bakteriellen Oxidasen ist die Situation nicht so eindeutig, auch wenn es Berichte über präparationsabhängige Eigenschaften der Soretbande oder von EPR-Signalen gibt (Hosler et al., 1992; Mitchell et al., 1995). Als Ursache für die beobachteten Unterschiede wurden Bindungen unterschiedlicher Liganden an das binukleare Zentrum herangezogen. In den Kristallstrukturen lässt sich zwar im oxidierten Zustand eine Elektronendichte zwischen Häm a_3 und Cu_B identifizieren, die Ursache hierfür wurde jedoch unterschiedlich interpretiert: Ostermeier et al. (1997) wiesen der Elektronendichte ein Wassermolekül an Häm a_3 und ein Hydroxidion am Cu_B zu. Dies wurde übereinstimmend auch in der Kristallstruktur der COX aus *Rhodobacter sphaeroides* beobachtet (Svensson-Ek et al., 2002). Im Rinderherzenzym hingegen wurde ein Sauerstoffmolekül in die Elektronendichte modelliert (Yoshikawa et al., 1998). EXAFS und ENDOR Studien unterstützten das Bild eines protonierbaren vierten Liganden am Cu_B , der zum Teil durch ein Chlorid ersetzt werden kann (Fann et al., 1995).

Die Heterogenitäten, die in der isolierten COX beobachtet werden, haben Einfluss auf die Reaktion der Oxidase mit verschiedenen Liganden. Hier manifestieren sich die Unterschiede und werden daher für die Charakterisierung der Enzympräparation herangezogen, wie die Reaktion von exogenen Reduktionsmitteln wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Kohlenmonoxid (CO), sowie die Bindungskinetik von Cyanid, das unterschiedlich schnell in Abhängigkeit des Zustandes der Oxidase gebunden wird. Verschiedene Raten der Cyanidbindung führten zur Klassifizierung der Cytochrom *c* Oxidase in eine sogenannte *schnelle* und *langsame* Form (Naqui et al., 1984; Young, 1988; Brudvig et al., 1981). Die beiden Formen lassen sich ineinander überführen. So führt Inkubation bei niedrigem pH zur Ausbildung der langsamen Form (Moody et al., 1991b; Baker et al., 1987). Diese geht einher mit einer Blauverschiebung des Soretmaximums (Papadopoulos et al., 1991) und einer verlangsamten Reaktion mit Dithionit.

Ein weiterer Grund, der für die Heterogenitäten herangeführt wird, ist die Bindung von Chlorid (Halogeniden) sowie weiterer kleinmoleküliger Liganden an das binukleare Zentrum. Dadurch wird der schnelle Elektronentransfer zwischen Häm *a* und Häm a_3 unterbunden und die oben erwähnte Reaktivität beeinflusst. Um das Enzym zurück in einen kompetenten reaktiven Zustand zu versetzen, sind Protokolle entwickelt worden, die allgemein als *Pulsen* bezeichnet werden: Grundlage ist das Durchlaufen eines katalytischen Zyklus der Oxidase, nach dem sich das Enzym wieder im oxidierten Zustand befindet. In diesem Fall jedoch ohne inhibierende Liganden im binuklearen Zentrum und damit mit einem wiederhergestellten schnellen Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen. Die gepulste Form zeichnet sich durch eine schnelle Cyanidbindungskinetik, sowie durch eine schnelle Elektronenäquilibrierung zwischen Häm *a* und dem binuklearen Zentrum aus (s. Moody, 1996).

Die Frage nach den Heterogenitäten in der Cytochrom *c* Oxidase ist ebenfalls eine nach dem Ausgangszustand und damit nach dem Einfluss der unterschiedlichen chemischen Strukturen des binuklearen Zentrums auf die Kinetik und Energetik der einzelnen

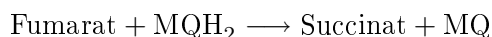
Übergänge im katalytischen Zyklus. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit sollen die für das Rinderherzenzym beschriebenen Aspekte und Phänomene am Enzym aus *Paracoccus denitrificans* näher untersucht werden.

1.3. Die Quinol-Fumarat-Reduktase

Für die Quinol-Fumarat-Reduktase sind eine Reihe an Übersichtsartikeln veröffentlicht worden, die sich mit Reaktionsmechanismus, Struktur und Enzymologie beschäftigen (Hagerhall, 1997; Ohnishi et al., 2000; Kröger et al., 2002; Lancaster, 2001; Lancaster and Simon, 2002). Auf sie soll hier als Referenz verwiesen werden.

1.3.1. Funktion und Struktur

Die Quinol-Fumarat-Reduktase (QFR) ist Bestandteil der anaeroben Atmungskette von *Wolinella succinogenes*, einem Vertreter der ϵ -Proteobakterien. In Analogie zur mitochondrialen Atmungskette wird in einer Reihe von Membrankomplexen die Energie aus der Oxidation der Substrate wie H_2 , $HCOOH$ oder H_2S zum Aufbau einer *PMF* genutzt (Kröger et al., 1992). Als terminaler Elektronenakzeptor dient Fumarat, das von der QFR zu Succinat reduziert wird. Anstatt Ubiquinol wird Menaquinol (MQ, 2-Methyl-3-(Isoprenyl) $_n$ -1,4-Naphthoquinol) als mobiler Elektronenträger gefunden ($E'_0 = -75$ mV).



Die QFR katalysiert demnach die Rückreaktion von Komplex II, der Succinat-Dehydrogenase (SDH). Tatsächlich ist sie nicht nur funktional, sondern auch strukturell und mechanistisch mit ihr eng verwandt. Zusammen werden sie unter dem Begriff der Succinat-Quinon-Oxidoreduktasen (SQOR) zusammengefasst. Die einzelnen Vertreter werden nach Art und Zahl der transmembranen Untereinheiten und prosthetischen Hämgruppen in fünf Klassen unterteilt (Lancaster, 2002b). Bisher sind die Strukturen der SDH aus *E. coli* (Yankovskaya et al., 2003), sowie die QFR's aus *Wolinella succinogenes* (Lancaster et al., 1999, siehe Abb. 1.6(a)) und *E. coli* bekannt (Iverson et al., 1999). Die QFR aus *Wolinella succinogenes*, die hier näher betrachtet werden soll, gehört zur B-Gruppe und liegt als Dimer eines Heterotrimer vor. Sie besitzt eine hydrophobe Untereinheit (FrdC) mit zwei *b*-Hämen (b_P proximales Häm, b_D distales Häm). Des weiteren nehmen am Elektronentransfer von Menaquinol auf Fumarat die drei Eisen-Schwefel-Zentren der FrdB-Untereinheit und das Flavinadenindinukleotid (FAD) aus der FrdA-Untereinheit als prosthetische Gruppen teil (Abb. 1.6(b)). Das natürliche Substrat für die QFR ist Menaquinol-6, sie reagiert jedoch auch mit einer Reihe anderer Quinole (Lemma et al., 1991), darunter das wasserlösliche 2,3-Dimethyl-1,4-Naphthoquinol (DMNH₂), das oft als Substrat in enzymatischen Messungen verwendet wird.

Die hydrophile Untereinheit FrdA umfasst den letzten Redox-aktiven Kofaktor, das FAD. In Kristallen, die in Gegenwart von Fumarat oder des kompetitiven Inhibitors Malonat gewachsen sind, konnte die Bindungsstelle von Fumarat in der Nähe des FAD lokalisiert werden. Die säurekatalysierte *trans*-Addition von H_2 an Fumarat wird durch FAD als Hydriddonor und Arg A301 als aktivierende Säure an der Doppelbindung des Fumarates vermittelt, wie anhand der Strukturen vorgeschlagen wurde (Lancaster et al., 2001). Unter aeroben Bedingungen stellt das FAD der QFR eine Quelle für die Generierung von reaktiven Sauerstoffprodukten dar (Messner and Imlay, 2002). Deshalb wird bei Anwesenheit

1. Einleitung

von Sauerstoff in fakultativ anaeroben Organismen wie *E. coli*, die neben einer QFR auch eine SDH besitzen, die SDH exprimiert, deren [2Fe-2S]-Zentrum ein gegenüber FAD höheres Mittelpunktspotential aufweist. Durch die veränderte Elektronenverteilung werden die reaktiven Spezies vermieden (Yankovskaya et al., 2003). Untereinheit FrdB komplexiert die drei Eisen-Schwefel-Zentren, die den Membranteil FrdC mit der katalytischen Seite der Fumaratreduktion verbinden. Hier in FrdC findet sich die Quinolbindungsstelle, sowie die beiden primären Elektronenakzeptoren, die *b*-Häme (s.u.). Während die ersten beiden Untereinheiten in der Familie der SQOR stark konserviert sind, finden sich in der hydrophoben Untereinheit die größten Unterschiede: Die QFR aus *E. coli* weist keine Häme auf; in der Kristallstruktur sind hier jedoch zwei Quinolbindungsstellen zu beobachten, die analog zu den Hämgruppen Q_D für die distale und Q_P für die proximale, also zur cytoplasmatischen Seite zugewandte Bindungsstelle benannt sind. Die Funktionalität der distalen Stelle ist fraglich und für den physiologischen Elektronentransfer wurde nur der von der proximalen Seite aus erwogen (Iverson et al., 2002). In der SDH aus *E. coli*, die nur eine Hämgruppe in der proximalen Stelle besitzt, findet sich ebenfalls in einer alternativen proximalen Stelle in der Nähe vom Häm *b* und dem [3Fe-3S]-Zentrum ein Ubiquinon (Yankovskaya et al., 2003). Dagegen ist eine Menaquinolbindungsstelle in der QFR aus *Wolinella succinogenes* noch nicht in den Kristallstrukturen beobachtet worden. Allerdings gibt es Evidenzen für eine distale Stelle (s.u.).

Die Redox-aktiven Kofaktoren weisen eine lineare Anordnung und Abstände auf (s. Abb. 1.6(b)), die Elektronentransfer von einer distalen Menaquinoloxidation über die Membran zum FAD der Fumaratreduktion erlauben. Abbildung 1.6(c) fasst die Messungen der Mittelpunktspotentiale der Kofaktoren, sowie die Geschwindigkeitsraten der Reduktion der QFR durch DMNH₂ oder der Oxidation durch Fumarat zusammen (Unden et al., 1984). Es wurde argumentiert, dass das sehr niedrige Oxidationspotential des [4Fe-4S]-Cluster eine Folge eines antikooperativen Effektes sei.

1.3.2. Reaktionsmechanismus der QFR und die Hypothese des E-Weges

Die Thermodynamik der Fumaratreduktion durch Menaquinol ($\Delta E'_0 = 0,105 \text{ V}$) schließt einen Beitrag der QFR aus *Wolinella succinogenes* zur *PMF* ($\Delta p = 0,17 \text{ V}$) aus (Kröger et al., 2002). Das konnte auch experimentell an einem rekonstituiertem System nachgewiesen werden (Biel et al., 2002). Dem gegenüber standen andere Befunde, die eine Menaquinoloxidation an der distalen Bindungsseite unterstützten: Durch Aufnahme der chemischen Protonen für die Succinatbildung von der cytoplasmatischen Seite, sowie eine nahe liegende Abgabe der Protonen aus der Menaquinoloxidation auf die periplasmatische Seite käme es jedoch zum Aufbau einer *PMF* über der Membran und einem Widerspruch zu den oben angeführten Daten. Lancaster (2002a) formulierte daraufhin die E-Weg Hypothese, um diese Unvereinbarkeit zu lösen. Zur Wahrung der Elektroneutralität wird der Elektronentransfer von Häm b_D über die Membran durch Protonentransfer von der periplasmatischen Seite auf die cytoplasmatische kompensiert. Die transiente Struktur für die Protonenleitfähigkeit wurde E-Weg aufgrund der Beteiligung eines Glutamatrestes benannt.

Eine Reihe von experimentellen Daten konnten diese These unterstützen. So führte Mutation des Glutamates Glu C66 nahe der periplasmatischen Seite zum Verlust der katalytischen Aktivität. Aufgrund der Nähe einer möglichen Quinolbindungsstelle wurde auf eine Beteiligung dieser Aminosäure am Transfer der Protonen aus der Menaquinoloxidation ge-

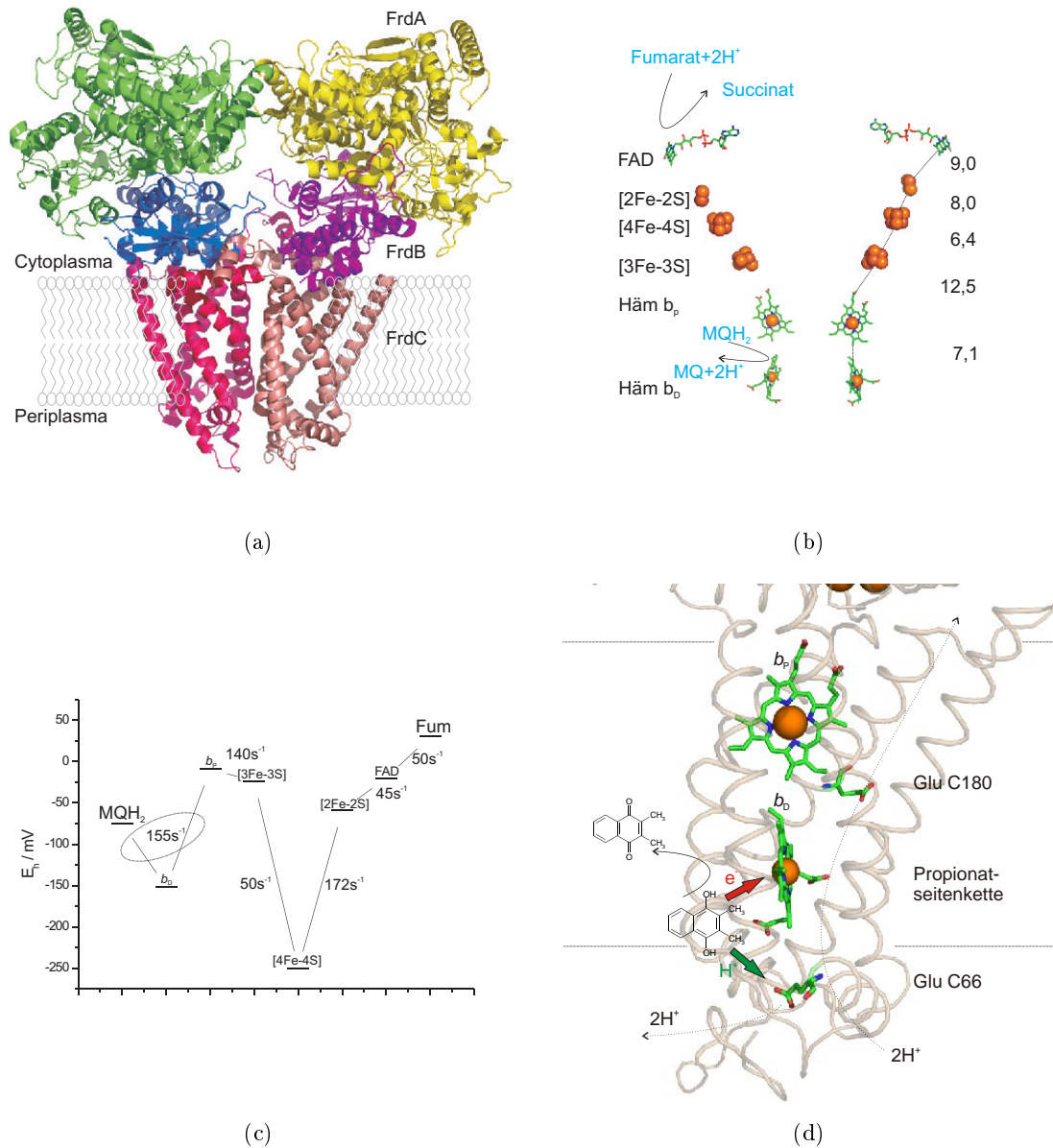


Abbildung 1.6.: (a) Struktur der dimeren QFR aus *Wolinella succinogenes* (PDB Code 1QLA). Die drei Untereinheiten eines Monomers sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. (b) Die Redoxaktiven Kofaktoren der QFR, sowie ihre Distanzen der kürzesten Verbindung in Å (nach Lancaster et al. (2000)). (c) Mittelpunktpotentiale der Kofaktoren und Ratenkonstanten aus *freeze-quench* EPR-Messungen der Reduktion der QFR mit DMNH₂ und der Oxidation durch Fumarat (Unden et al., 1984). (d) E-Weg Hypothese nach Lancaster (2002a): Die Oxidation von DMNH₂ führt zur Freisetzung der Protonen auf der periplasmatischen Seite *via* Glu C66. Elektronentransport von Häm b_D auf b_P wird elektrisch durch Protonentransport auf die cytoplasmatische Seite *via* den Hämpropionaten und Glu C180 kompensiert.

1. Einleitung

schlossen (Lancaster et al., 2000). Elektrostatische Berechnungen erlaubten eine Zuordnung der apparenten Mittelpunktpotentiale mit den beiden Hämgruppen: So zeigte das distale Häm ein niedrigeres Oxidationspotential ($b_D = b_I$) als das proximale ($b_P = b_H$), wie es für einen funktionalen Elektronentransfer zum FAD zu erwarten ist (Haas and Lancaster, 2004). Darüber hinaus unterstützten diese Rechnungen eine Kopplung des Protonierungszustandes von Glu C180 mit dem Reduktionszustand der Hämgruppen. Reduktion von Häm b_D führt zur Protonierung von Glu C180, wodurch der kompensatorischer Mechanismus über den E-Weg in Gang gesetzt werden könnte. Die Protonierungsänderungen einer Säuregruppe, sowie der Hämpropionate von Häm b_D mit dem Potential konnten auch experimentell mit Redox-induzierten FT-IR Differenzspektren nachgewiesen werden (Haas et al., 2005; Mileni et al., 2005). Abbildung 1.6(d) fasst die Hinweise auf den E-Weg zusammen. Interessanterweise wurde für die SDH aus *Bacillus subtilis* vorgeschlagen, dass die endergonische Reduktion von Menaquinon durch Succinat von einer *PMF* angetrieben wird (Schirawski and Unden, 1998), bzw. dass die reverse Reaktion eine *PMF* aufbaut (Schnorpfel et al., 2001), auch wenn der spezifische Effekt der Membranenergetisierung auf die SDH-Aktivität angezweifelt wurde (Azarkina and Konstantinov, 2002; Fernandes et al., 2005). Diese Beobachtungen legen für andere Dihäm-SQOR's ebenfalls eine distale Quinolbindungstelle nahe, die im Falle der QFR aus *Wolinella succinogenes* mit den thermodynamischen und experimentellen Daten durch die E-Weg Hypothese in Einklang zu bringen sind. Die Beobachtung von transienten Protonen- und Elektronenbewegungen, sowie die Art der möglichen Kopplung könnten in kinetischen Messungen nachgewiesen werden und damit die Hypothese substantiell unterstützen.

1.4. Der bc_1 -Komplex

1.4.1. Struktur und Funktion

Komplex III, die Ubiquinol-Cytochrom *c* Reduktase oder der bc_1 -Komplex ist Bestandteil sowohl der Atmungskette als auch der Photosynthese (für eine Übersicht s. Berry et al., 2000; Link, 2001; Crofts, 2004a). Er überträgt die Elektronen des Zweielektronenträgers Ubiquinol (UQH_2) auf den Einelektronenträger Cytochrom *c* und trägt zum Aufbau einer *PMF* bei. Der katalytisch aktive Teil besteht aus drei Untereinheiten, dem Cytochrom *b*, dem Cytochrom c_1 und dem Rieske-Protein, das ein $[2Fe-2S]$ -Zentrum bindet. Diese einfache Bauart findet sich in Bakterien, während die eukaryontischen Vertreter eine größere Anzahl an Untereinheiten aufweisen. So besitzt der bc_1 -Komplex aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zehn Untereinheiten, von denen neun in Abbildung 1.7 dargestellt sind (Hunte et al., 2000). Neben der Struktur des Hefekomplexes sind weiterhin die Komplexe aus Huhn (Zhang et al., 1998b), aus dem Rinderherz (Xia et al., 1997) und aus *Rhodobacter capsulatus* (Berry et al., 2004), sowie die Cytochrom b_6f -Komplexe aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Stroebel et al., 2003) und *Mastigocladus laminosus* (Kurusu et al., 2003) bekannt. Er liegt als funktionelles Dimer vor mit Cytochrom *b* und seinen acht Transmembranhelices als Kernuntereinheit, das die beiden *b*-Typ Häme nichtkovalent koordiniert, b_H das Hochpotentialhäm und b_L das Niederpotentialhäm. Das Rieske-Protein eines Monomers reicht mit seiner Transmembranhelix in den Membranteil des Cytochrom *b* des anderen Monomers.

Abbildung 1.7 stellt die kürzesten Distanzen zwischen den einzelnen Kofaktoren dar. Aufgrund der Distanz ist intramolekularer Elektronentransfer zwischen Häm b_L und b_H ein

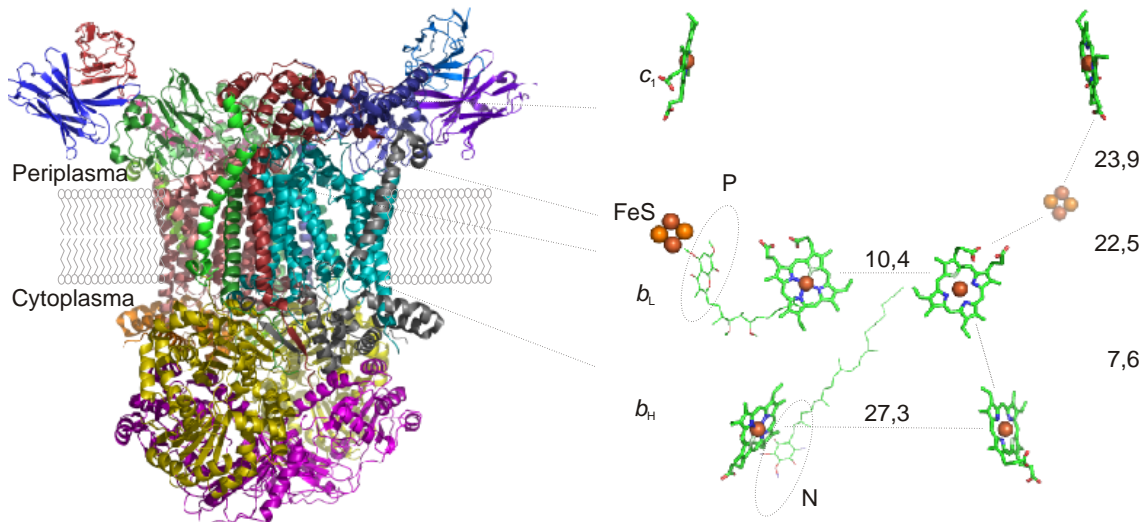


Abbildung 1.7.: Struktur des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae*: Die einzelnen Untereinheiten des dimeren Holoenzym, sowie die leichte und schwere Kette des für die Kristallisation verwendeten F_v -Fragmentes sind farbig dargestellt (PDB Code 1EZV). Vergrößert sind die vier prosthetischen Gruppen pro Monomer dargestellt, wobei zu beachten ist, dass das Rieske-Protein mit seinem Eisen-Schwefel-Zentrum jeweils im anderen Monomer seine transmembrale Verankerung besitzt. Im P-Zentrum oder der Q_o -Bindungsstelle sitzt der Inhibitor Stigmatellin, im N-Zentrum oder der Q_i -Bindungsstelle das natürliche Substrat Ubiquinon-6. Die gestrichelten Linien markieren die kürzesten Distanzen zwischen den Kofaktoren, die in Å angegeben sind.

schneller Prozess im Mikrosekundenbereich. Zwischen Häm b_L und dem Eisen-Schwefel-Zentrum befindet sich das so genannte P-Zentrum (für positiv geladene Seite der Membran), in dem die Quinoloxidation stattfindet. Es wird auch die Bezeichnung Q_o -Bindungsstelle verwendet. In den Kristallstrukturen konnte bisher kein Quinolmolekül in dieser Bindungsstelle stabilisiert werden. Es finden sich jedoch Strukturen, die spezifische Inhibitoren binden, die unterschiedliche katalytische Zustände imitieren (Hunte et al., 2000; Palsdottir et al., 2003) und somit die Quinolbindungsstelle lokalisieren lassen. Die Entfernung zwischen Häm b_L und $[2Fe-2S]$ ist zu groß für einen schnellen Elektronentransfer, während ein Quinolmolekül in der Q_o -Bindungsstelle mit beiden Kofaktoren reagieren kann. Eine interessante Besonderheit des bc_1 -Komplexes stellt die große konformationelle Flexibilität des Rieske-Proteins dar. Der hydrophile Teil dieser Untereinheit kann sich zwischen zwei Positionen bewegen: In der b -Position, die auch in Abbildung 1.7 dargestellt ist, befindet sich das Eisen-Schwefel-Zentrum in der Nähe des P-Zentrums und kann Elektronen des Quinols aufnehmen. Auf der anderen Seite befindet sich das Rieske-Protein in der c -Position, in der Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel-Zentrum auf das Cytochrom c_1 stattfindet. Die schnelle Beweglichkeit des Rieske-Proteins ist eine wesentliche Voraussetzung für schnellen Elektronentransfer in der Hochpotentialkette, bestehend aus dem Eisen-Schwefel-Zentrum ($E'_0 = 285 \text{ mV}$) und Häm c_1 ($E'_0 = 250 \text{ mV}$) (für eine Übersicht s. Darrouzet et al., 2001). Die Niederpotentialkette umfasst die beiden b -Häme, wobei Häm b_H ein höheres Mittelpunktspotential ($E'_0 = 80 \text{ mV}$) als Häm b_L ($E'_0 = -55 \text{ mV}$) besitzt (Salerno et al., 1989). In der Nähe von Häm b_H ($\approx 5 \text{ Å}$) konnte das natürliche Substrat des Hefekomplexes Ubiquinon-6 identifiziert werden. Die Stelle der Quinonreduktion wird

1. Einleitung

auch N-Zentrum (negativ geladene Seite der Membran) genannt.

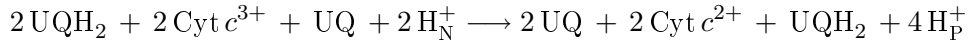
Für die beiden Quinonbindungsstellen gibt es jeweils spezifische Inhibitoren, die für funktionelle Untersuchungen sehr hilfreich sind. Sie werden aufgrund ihrer Wirkung in unterschiedliche Klassen unterteilt (s. Esser et al., 2004, für eine Klassifizierung). Antimycin ist ein klassischer Inhibitor der Q_i -Bindungsstelle, während Stigmatellin und Myxothiazol an die Q_o -Bindungsstelle binden. Aus den verschiedenen Strukturen des bc_1 -Komplex lässt sich erkennen, dass die Quinonbindungsstellen im Membranteil des Proteins verborgen liegen. Dadurch werden Protonentransferwege für die mit Protonen gekoppelten Redoxprozesse notwendig, um eine schnelle Aufnahme oder Abgabe in die wässrige Phase zu gewährleisten (siehe Abbildung 3.28 auf S.69). In der Q_o -Bindungsstelle werden die beiden Protonen der Quinoloxidation auf verschiedenen Wegen zur periplasmatischen Seite hin abgegeben. Das Quinol geht eine Wasserstoffbrückenbindung zum H181 ein, einem Liganden des Eisen-Schwefel-Zentrums (Hunte et al., 2000). Bei Reduktion des Eisen-Schwefel-Zentrums durch das Quinol fungiert das H181 als einer der beiden Protonenakzeptoren für die Protonen aus der Quinoloxidation, weshalb die Reaktion formal einem Wasserstofftransfer entspricht (Crofts, 2004b). Die Anwesenheit dieses Aminosäurerestes ist für die Funktionalität unerlässlich. Kürzlich wurde mittels Infrarotspektroskopie ein Redox-Bohr Effekt für ein Imidazol/Imidazolat Paar nachgewiesen, der im Sinne dieser ersten Protonierungsreaktion interpretiert wurde (Iwaki et al., 2005). Dem zweiten Proton öffnet sich nach Reduktion von Häm b_L ein Protonentransferweg, bestehend aus einer Kette von Wassermolekülen, die durch die Seitenketten von R79, N256, Y132, Y274 und R70 und die Propionatseitenkette von Häm b_L stabilisiert werden (Palsdottir et al., 2003). Verantwortlich hierfür ist eine Rotation der Seitenkette von E272, die auch den ersten Protonenakzeptor in dieser Kette darstellt (Iwaki et al., 2003; Baymann et al., 1999).

In der Kristallstruktur des Hefe-Komplexes mit seinem natürlichen Substrat Ubiquinon-6 wurden auch für die Q_i -Bindungsstelle Protonenwege identifiziert (Hunte et al., 2000). D229 und H202 gelten als primäre Protonendonoren, die auch zusammen mit N208 an der Stabilisierung des Semiquinons über Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind (Kolling et al., 2003; Dikanov et al., 2004). Zwei Transferwege, der E/R- und der CL/K-Weg führen zu den beiden möglichen Donoren (siehe Abb. 3.28 auf S.69), wobei interessanterweise im CL/K-Weg eine Phosphodiesterbrücke eines gebundenen Cardiolipins beteiligt ist (Lange et al., 2001; Hunte et al., 2003).

1.4.2. Der Q-Zyklus des bc_1 -Komplexes

Der bc_1 -Komplex ist eine direkte Protonenpumpe, bei der die Redoxchemie des Quinons, Aufnahme oder Abgabe von zwei Elektronen und zwei Protonen, zum Aufbau einer PMF führt. Essentiell für diesen Mechanismus ist die Architektur der daran beteiligten katalytischen Zentren: Reduktion des Quinons und die damit verbundene Aufnahme von Protonen findet von der N-Seite statt, bei Oxidation des Quinols hingegen werden die Protonen zur P-Seite hin abgegeben. Mitchell (1975) formulierte diese Arbeitsweise für den bc_1 -Komplex, den er Q-Zyklus nannte und dessen wesentliche Eigenschaften weiterhin Bestand haben. Abbildung 1.8 beschreibt einen vollständigen Zyklus. Ubiquinol wird in der zur P-Seite liegenden Q_o -Bindungsstelle gebunden. Oxidation führt zur Aufspaltung der beiden Elektronen zwischen dem Rieske-Protein und den b -Hämen und der Freisetzung der Protonen auf die P-Seite. Wie oben erwähnt, führt eine Bewegung des Rieske-Proteins zum anschließenden Elektronentransfer auf Häm c_1 und schließlich auf das mobile Cytochrom c . Ubiquinon

stellt auf der anderen Seite das Oxidationsmittel für die kommunizierenden b -Häme dar. Elektronentransfer von Häm b_L auf Häm b_H führt zusammen mit einem Proton von der N-Seite zur Bildung eines Semiquinons in der Q_i -Bindungsstelle, die zur N-Seite hin ausgerichtet ist. Eine zweite Runde der Quinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle fügt sich nun an, um den Zyklus zu beenden. Cytochrom c wird wieder auf der Hochpotentialseite reduziert, Oxidationsmittel auf der Niederpotentialseite ist nun das in der Q_i -Bindungsstelle gebundene Semiquinon, aus dem ein neues Quinol gebildet wird. Die freie Diffusion von Quinol und Quinon durch die Membran zu den jeweiligen Bindungsstellen ermöglicht einen neuen Beginn des Q-Zyklus. Die Stöchiometrie lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:



Auf zwei Besonderheiten des Q-Zyklus soll hier die Aufmerksamkeit gelenkt werden: Der bc_1 -Komplex besitzt einen intramolekularen Redoxloop aufgrund seiner beiden Quinonbindungsstellen und seiner Reduktase- bzw. Oxidaseaktivität gegenüber Ubiquinon. Diese Doppelfunktion erfordert eine effiziente Elektronenaufteilung in der Q_o -Bindungsstelle und eine Vermeidung von Kurzschlussreaktionen. Insbesondere dieser zweite Punkt wird sehr kontrovers diskutiert. Wie verläuft die Quinoloxidation und wie vermeidet der bc_1 -Komplex Elektronentransfer vom Niederpotentialast, den b -Hämen, auf den thermodynamisch günstigeren Hochpotentialast? Detailliertere Reaktionsmodelle, basierend auf dem Q-Zyklus, beschreiben die Chemie der Quinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle, die molekulare Konfiguration, die Quinoloxidation erlaubt und auslöst, sowie die Kommunikation der Redox-aktiven Kofaktoren:

- Sehr kontrovers sind die Ansichten zu einer möglichen Anwesenheit eines Semiquinonradikals in der periplasmatischen Bindungsstelle (Q_o -Bindungsstelle), bzw. zur Vermeidung eines solchen bei der Oxidation zum Quinon. Hierfür wurde eine echte Zweielektronenoxidation innerhalb der Reorganisationszeit vorgeschlagen, die das Aufkommen eines Semiquinons gänzlich vermeidet (Osyczka et al., 2004). Andererseits findet man das Modell einer sequentiellen Einelektronenoxidation, wobei der zweite Reaktionsschritt ungleich schneller als der erste stattfindet und somit die Instabilität eines Semiquinons widerspiegelt (Jünemann et al., 1998). Die Anwesenheit eines Semiquinonradikals wurde unter anderem mit einer gegenüber P-Typ Inhibitoren empfindlichen Superoxidproduktion in der Q_o -Bindungsstelle als Nebenprodukt begründet (Zhang et al., 1998a; Muller et al., 2002, 2003).
- Eng verknüpft mit der ersten Fragestellung sind die entsprechenden Kontrollmechanismen in der Q_o -Bindungsstelle: Quinoloxidation darf nur in Anwesenheit der beiden Oxidationspartner und/oder der Protonenakzeptoren stattfinden. In vielen Modellen wird die Mobilität des Rieske-Proteins (Darrouzet et al., 2001) zur Kontrolle der Quinoloxidation verwendet: Der Elektronentransfer auf das Eisen-Schwefel-Zentrum findet dabei in Abhängigkeit des Redoxzustandes von b_L oder der Quinole in der Q_o -Bindungsstelle und Q_i -Bindungsstelle statt (Brandt, 1998; Link, 1997; Yu et al., 2002). Andererseits wurde auf die verschiedenen Positionen von Inhibitoren in der Q_o -Bindungsstelle hingewiesen (Esser et al., 2004), was sich in Modellen niederschlägt, in denen sich die Quinolposition mit dem Oxidationszustand des Quinols (Crofts et al., 1999b,a, 2006) oder des Eisen-Schwefel-Zentrums ändert (Brandt and

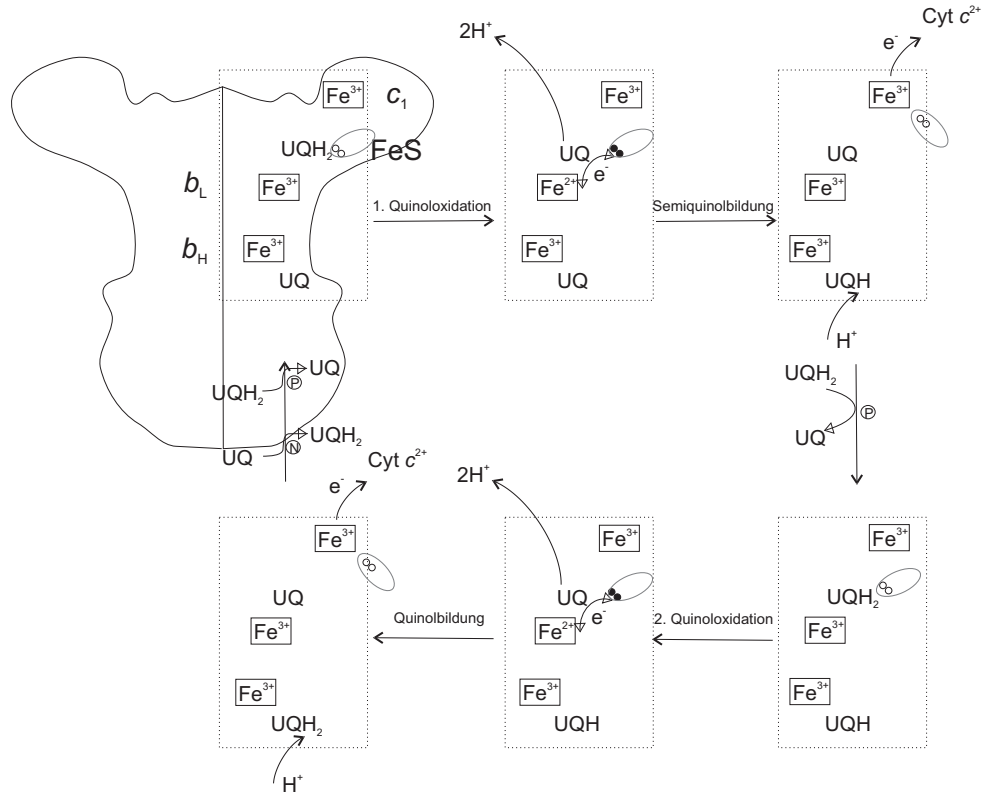


Abbildung 1.8.: Q-Zyklus: Trennung der Orte für Quinoloxidation und -reduktion und vektorielle Protonenabgabe bzw. -aufnahme führen zur Erzeugung einer *PMF*. Die Quinoloxidation findet in der Q₀-Bindungsstelle statt. Elektronenbifurkation zwischen dem Hoch- und Niederpotentialast führt zur Reduktion des Eisen-Schwefel-Zentrums (schwarze Kreise) an der *b*-Position und anschließender Reduktion von Cytochrom *c* via Cytochrom *c*₁ an der *c*-Position sowie der Bildung eines Semiquinons in der Q_i-Bindungsstelle. Die Protonen aus der Quinoloxidation werden auf die periplasmatische Seite abgegeben, während das für die Semiquinolbildung von der Matrix aufgenommen wird. Eine zweite Quinoloxidation in der Q₀-Bindungsstelle führt wieder zu denselben Ereignissen mit dem Ergebnis einer erneuten Cytochrom *c*-Reduktion und der Bildung eines Quinols in der Q_i-Bindungsstelle. Freisetzung und Bindung von Quinonen in den beiden Zentren führt wieder zur Ausgangslage.

von Jagow, 1991). Weitere Modelle garantieren effektive Elektronenaufteilung durch Kontrolle der Quinolbindung in Abhängigkeit der Redoxzustände der anderen Kofaktoren (Snyder et al., 2000; Brandt, 1996a) oder für eine Oxidation notwendige Wasserstoffbrückenbindungen (Rich, 2004). Auch der Anwesenheit von zwei Quinonmolekülen in der Q_o -Bindungsstelle wurde eine mechanistische Bedeutung zugewiesen (Brandt, 1996b; Ding et al., 1992, 1995; Bartoschek et al., 2001). Bezüglich der Quinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle wurden im Zusammenhang der verschiedenen Modelle Fragen zur Reversibilität, zu unproduktiven Kurzschlussreaktionen und zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in mehreren Übersichtsartikeln diskutiert (Mulikidjanian, 2005; Crofts, 2004b; Osyczka et al., 2005).

- Neben lokalen Veränderungen in der Q_o -Bindungsstelle nach Quinolbindung sind weitere Modelle vorgeschlagen worden, die die gegenseitige Kontrolle der beiden Elektronenwege im bc_1 -Komplex, dem Nieder- und Hochpotentialast, betonen (Snyder et al., 2000), sowie einer sogenannten Halbseitenaktivität, bei der nur ein Monomer im dimeren bc_1 -Komplex Aktivität besitzt (Trumpower, 2002). Dies wird durch eine antikooperative Bindung der Quinolmoleküle in der Q_o -Bindungsstelle im Zusammenspiel mit dem Rieske-Protein vermittelt, wie sie aus Titrations mit Inhibitoren geschlossen wurde (Gutierrez-Cirlos and Trumpower, 2002): Strukturelle Änderungen würden durch das Rieske-Protein von der Q_o -Bindungsstelle des einen Monomers im Dimer, das mit der peripheren Domäne des Rieske-Proteins wechselwirkt, über den Transmembrananker des Rieske-Proteins, das in das Cytochrom *b* des anderen Monomers hinüberreicht, transduziert. Unterstützend für diese Hypothese wurde auch die Kristallstruktur des bc_1 -Komplex mit seinem Substrat Cytochrom *c* interpretiert, das nur an einer Seite im Dimer gebunden vorgefunden wurde (Lange and Hunte, 2002). Doch nicht nur die antikooperative Bindung ist ein Indiz für eine Kommunikation zwischen den Monomeren; auch Elektronentransfer zwischen den b_L -Hämen, die sich an den Pyrrolringen bis auf ≈ 11 Å annähern, ist unter Antimycin inhibierenden Bedingungen gezeigt worden (Covian et al., 2004; Covian and Trumpower, 2005).

1.4.3. Kinetische Messungen am bc_1 -Komplex

Im Falle des bc_1 -Komplex sind bisher verschiedene Strategien für kinetische Studien erfolgreich durchgeführt worden. Insbesondere wurden viele Daten aus Messungen an Chromatophoren erhalten, die bei Blitzlichtbelichtung den Quinonpool reduzieren (Gennis et al., 1993; Crofts and Wraight, 1983). Dabei lassen sich entweder die Redox-induzierten Änderungen der Häme spektroskopisch beobachten (Bowyer and Crofts, 1981; Prince et al., 1978), oder es lässt sich der Spannungsaufbau über der Membran optisch anhand der elektrophromen Verschiebung von Carotinoiden (Jackson and Crofts, 1971; Drachev et al., 1989; Crofts et al., 2003) oder elektrometrisch mit der *BLM*-Technik (s.u., Drachev et al., 1989; Mulikidjanian et al., 1990; Klishin et al., 2002) verfolgen. Protonenbewegungen lassen sich mit Hilfe von geeigneten Indikatoren verfolgen (Petty et al., 1977, 1979; Mulikidjanian and Junge, 1994). Weiterhin sind Reaktionen von bc_1 -Komplex und seinen Substraten durch schnelles Mischen (King et al., 1975; De Vries et al., 1982) oder durch einen Substratsprung nach Photolyse eines *caged* Quinols (Hansen et al., 2000) gestartet worden. Die Identifizierung der elektrogenen Schritte brachte dabei erstaunliche Resultate zu Tage (Mulikidjanian and Junge, 1995). Ubiquinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle führt zu Reaktionen, die

1. Einleitung

sich in zwei Zeitbereiche aufteilen lassen: Einer schnelleren Häm b_H Reduktion folgen Protonenabgabe, Häm c_1 Reduktion und der Aufbau eines Potentials, die durch die Oxidation von b_H kontrolliert werden. Der transmembrale Elektronentransfer von b_L auf b_H , der mit einer Zeitkonstante von 0,1 ms abläuft (Shinkarev et al., 2001), ist nicht elektrogen und muss daher durch interne Ladungsbewegungen kompensiert werden (Mulkidjanian et al., 1991). Gemein ist all diesen Messungen, dass sie durch Diffusion in ihrer Zeitauflösung limitiert sind, die sowohl bei den Chromatophoren (Meinhardt and Crofts, 1982; Crofts and Wang, 1989) als auch bei den schnellsten *freeze-quench* Messungen (Zhu et al., 2005) bei ≈ 150 ps liegt.

Die Verwendung von organometallischen Rutheniumkomplexen, die im angeregten Zustand ein hohes Oxidationspotential besitzen, öffnet einen anderen Zugang zu kinetischen Experimenten am bc_1 -Komplex (Millett and Durham, 2004, 2002). Photooxidation von Häm c_1 führt zu einer biphasischen Rereduktion zum einen durch schnellen Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel-Zentrum auf Häm c_1 , zum anderen durch Quinioxidation in der Q_o -Bindungsstelle (Sadoski et al., 2000). Aus der pH-Abhängigkeit des schnellen Prozesses, wobei durch den pH-Wert das Mittelpunktspotential des Eisen-Schwefel Zentrums und somit die Triebkraft für diese Reaktion moduliert werden kann, wurde geschlossen, dass die Barriere in der konformationellen Ausrichtung des Rieske-Proteins liegt (Engstrom et al., 2002; Xiao et al., 2003).

1.5. Elektrometrische Untersuchungen zum Protonen gekoppelten Elektronentransfer

Obwohl unterschiedlich in Funktionsweise und katalysierter Reaktion, ist den drei hier vorgestellten Komplexen der Atmungskette allen ein Protonen gekoppelter Elektronentransfer gemein. Dieses Phänomen verlangt eine kinetische Beschreibung zur Unterscheidung verschiedener Reaktionsmodelle. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, finden sich verschiedene Arten der Kopplung. Während sich die Elektronenbewegungen anhand der Redox-induzierten Differenzspektren der beteiligten Kofaktoren mit spektroskopischen Methoden verfolgen lassen, stellen die Protonenbewegungen experimentell ein anderes Problem dar. In elektrischen Messungen kann die Natur der Protonen und Elektronen als Ladungsträger ausgenutzt werden. Mit Hilfe einer elektrometrischen Methode lassen sich Ladungsverschiebungen über eine Lipidmembran in hoher Zeitauflösung verfolgen: Durch diesen Ansatz lassen sich daher sowohl Protonen- als auch Elektronenbewegungen erfassen und mit Hilfe von spektroskopischen und anderen komplementären Messungen in ihrem zeitlichen Verlauf zuordnen. Besonders in Hinblick auf die Protonenbewegungen stellt diese Methodik eine der wenigen Möglichkeiten dar, Protonentransfer kinetisch zu untersuchen.

Insbesondere für bioenergetische Systeme wie die Enzyme der Atmungskette (Zaslavsky et al., 1993; Mulkidjanian et al., 1990; Christensen et al., 1988), Photosysteme (Drachev et al., 1979) oder das Bakteriorhodopsin (Bamberg et al., 1979) ist diese Methode eine wichtige Informationsquelle, da diese Proteine am Aufbau einer *PMF*, also dem Protonentransport über die innere Mitochondrien- oder Chloroplastenmembran sowie über die bakterielle Zellmembran beteiligt sind. Mit Hilfe von elektrometrischen Messungen soll an den hier vorgestellten Komplexen der Protonen gekoppelte Elektronentransfer näher untersucht werden, um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu charakterisieren. So stellt sich die Frage nach der Gültigkeit der Elektroneutralität, nach der der Ladungstransfer

der negativ geladenen Elektronen in einen Enzymkomplex niedriger Dielektrizität durch die Aufnahme eines positiv geladenen Protons ausgeglichen wird. Weiterhin bleibt es wichtig, die Schritte des Elektronentransfers zu identifizieren, die strikt unter der Kontrolle einer Protonierungsreaktion stehen und auf welche Art diese Kontrolle ausgeübt wird.

Aus den elektrometrischen Messungen lassen sich mit Hilfe verschiedener kinetischer Parameter Aussagen zu diesen fundamentalen Fragen treffen. Verschiedene Phasen des Ladungstransportes lassen sich mit den jeweiligen Zeitkonstanten beschreiben, der Isotopeneffekt gibt Aufschluss über den Protonentransfer und seinen möglichen Einfluss auf die Elektronentransferrate und Aktivierungsenergien können im Rahmen verschiedener Modelle von chemischen Reaktionen beschrieben werden. Die Integration der kinetischen Messungen mit den vorhandenen strukturellen und spektroskopischen Daten führt zu Modellvorstellungen, in deren Rahmen sich die Mechanismen der verschiedenen Enzymkomplexe diskutieren und ausschließen lassen.

Zielsetzung Für die einzelnen Komplexe ergeben sich daraus unterschiedliche Zielsetzungen:

- Für die Cytochrom *c* Oxidase ist schon ein Protokoll für eine schnelle lichtaktivierbare Photoreduktion vorhanden. Mit Hilfe von elektrometrischen Messungen soll die Rolle des K-Kanals im reduktiven Teil des katalytischen Zyklus nochmals näher betrachtet werden. Neben einer allgemeinen Beschreibung geht es hierbei um den Vergleich und Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen auf den O→E-Übergang. Hierbei wird die Rolle des K-Kanals durch den Vergleich von Wildtyp und einer K-Kanalmutante beleuchtet, sowie durch den Vergleich von Oxidasen aus unterschiedlichen Organismen, die Variabilitäten in der Bauweise des K-Kanals aufweisen. Um einen detaillierteren Einblick in den Ladungstransport zu gewinnen, spielt besonders die Temperaturabhängigkeit und der kinetische Isotopeneffekt des O→E-Überganges eine wichtige Rolle, dessen Ergebnisse im Rahmen der verschiedenen Reaktionsmodelle diskutiert werden sollen. Als zweites steht der oxidative Teilzyklus im Mittelpunkt. Hier soll die Darstellung des P-Zustandes für das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* untersucht werden, der als Ausgangszustand für elektrometrische Messungen im P→F-Übergang dient und hierfür in hoher Ausbeute vorhanden sein muss. Das Protonenpumpen soll weiterhin anhand einer Mutante untersucht werden: Die Entdeckung einer entkoppelten Mutante, die bei normaler Aktivität der Sauerstoffreduktion keine Protonen mehr pumpt, könnte eine Möglichkeit sein, den Mechanismus des Protonenpumpens besser zu charakterisieren. Einzelne Übergänge des katalytischen Zyklus sollen an der Mutante elektrometrisch gemessen werden und mit den Daten des Wildtyps und einer weiteren Mutante verglichen werden.
- Die QFR aus *Wolinella succinogenes* stellt das zweite Objekt für kinetische Messungen dar. Bei ihr ergibt sich die Problematik, dass ihre Reaktion nicht schnell gestartet werden kann. Daher soll hier als erster Schritt eine Substanz synthetisiert werden, die sich photolytisch spalten lässt und deren Freisetzungsprodukte zur Aktivierung der QFR führen. Neben der Synthese steht die grundlegende Charakterisierung, sowie die Eignung für elektrometrische oder spektroskopische Messungen an der QFR im Mittelpunkt.

1. Einleitung

- Ähnlich gelagert ist die Problemstellung für den bc_1 -Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae*. Für eine effiziente Aktivierung des Komplexes steht hier als Vorstufe die Darstellung zweier künstlicher Substrate, die ähnlich dem Fall der COX bei Lichtanregung schnell zur Reduktion oder Oxidation des Komplexes führen. Neben der Charakterisierung der Syntheseprodukte soll eine generelle Machbarkeit für elektrometrische Messungen mit diesem System gezeigt werden, sowie die zu erwartenden und gefundenen Ladungsbewegungen verglichen werden und im Zusammenhang mit dem Reaktionsmodell interpretiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Methoden

Tris(2,2'-bipyridyl)-ruthenium(II)-dichlorid (Rubpy) wurde von Aldrich (Nr. 224 758 oder 544 981) bezogen. Lipide für die Rekonstitution in Proteoliposomen wurden von *Avanti Polar Lipids* gekauft, und wenn nicht weiter angegeben, unbehandelt verwendet. Chemikalien für die chemischen Synthesen sowie für alle weiteren Laborarbeiten wurden von Merck, Fluka, Aldrich oder Sigma erhalten. Alle Chemikalien waren mindestens vom Reinheitsgrad *p. a.*

2.1.1. Herstellung von Proteoliposomen

Die Herstellung der Proteoliposomen stellt eine Abänderung der klassischen Cholatdialyse dar (Kagawa and Racker, 1971). Cholsäure (*Fluka*) für die Solubilisierung der Lipide wurde zuvor aus Ethanol umkristallisiert. Für die elektrometrischen Messungen wird meistens ein polarer Extrakt des Gesamtlipids aus *E. coli* verwendet (*Avanti* Nr. 100500), in manchen Fällen jedoch eine Mischung aus synthetischen Lipiden, Dioleoylphosphatidylethanolamin:Dioleoylphosphatidylcholin (2:1 [n/n]). Das Lösungsmittel der Lipide, Chloroform, wird an einem Rotationsverdampfer unter einem Stickstoffstrahl abgedampft. Zur Entfernung von Resten wird für ca. 30 min ein Vakuum mit der Ölpumpe angelegt. Anschließend wird die entsprechende Menge des Solubilisierungspuffers mit 2% Cholat zugegeben und mit Stickstoff überschichtet. Die Endkonzentration an Lipid dieser Lösung beträgt 20 mg/ml. Als Solubilisierungspuffer wird meistens 50 mM HEPES, pH 7,4, oder 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, für die Temperaturmessungen an der COX verwendet. In kleinen Abänderungen kann der Puffer in einem pH-Bereich zwischen 6,8-8,4 auch variiert werden. Die Lipide werden nun für 1,5-2 h auf Eis solubilisiert. Die Enzyme werden für ca. 30 min in den Solubilisierungspuffer aus ihren Stammlösungen verdünnt (Endkonzentration 1-2 mg/ml). Die Lipidmischung wird anschließend mit Kühlungsintervallen beschallt (Branson-Sonifier 250, 30% *duty cycle*, 3 *output control*), bis die Lipidlösung aufklart und nur eine leichte Opaleszenz zu erkennen ist. Ungelöste Teile werden durch Zentrifugation entfernt (5 min bei 7000 g). Die Lipidlösung wird nun mit den Enzymen 1:1 gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Endkonzentration an Lipid beträgt 10 mg/ml, das Lipid:Protein-Verhältnis [m/m] ist 20:1 für die COX und je 10:1 für die QFR und den *bc₁*-Komplex.

Das Detergens wird der Lösung nun durch Adsorption an ein hydrophobes Copolymer entzogen. Hierzu werden dem Ansatz 400 mg/ml gewaschene Bio-Beads SM2 (*Bio-Rad*) zugefügt (Holloway, 1973). Dieser wird nun über Nacht im Kühlraum geschüttelt. Danach werden nach Entfernung der alten Bio-Beads neue bis zu 250 mg/ml hinzugefügt und bei Raumtemperatur für eine Stunde geschüttelt. Der Ansatz wird von den Bio-Beads getrennt und zwei Mal für 5 min bei 7000 g zentrifugiert. Die Proteoliposomen können nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert werden. In den meisten Messungen wurden hingegen frisch präparierte Proteoliposomen verwendet, die bis zu vier Tage im

2. Material und Methoden

Kühlschrank aufbewahrt werden können.

Als weitere Abwandlung wurden den Lipidmischungen noch weitere Zusätze hinzugefügt. Für manche Messungen mit der COX und dem bc_1 -Komplex war zusätzlich zu den synthetischen Lipiden Tetraoleoylcardiolipin (CA) anwesend (DOPE:DOPC:CA (2:1:0,075) [n]). In manchen Präparationen der QFR-Proteoliposomen wurde Phylloquinon (Vitamin K₁, *Sigma*) beige setzt (100 $\mu\text{mol/g}$ Lipid).

2.1.2. Die Cytochrom c Oxidase

Die Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* wurde freundlicherweise in den Gruppen Prof. Michel (Abt. Mol. Membr., MPI für Biophysik, Frankfurt), Prof. Ludwig (Institut für Biochemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt) und Prof. Grell (Abt. Biophys. Chemie, MPI für Biophysik, Frankfurt) aufgereinigt und zur Verfügung gestellt. Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene Enzympräparationen verwendet, die sich zum Teil in ihrem Aufreinigungsprotokoll unterschieden, die „klassische“ Variante (Hendler et al., 1991) sowie einem erweiterten Protokoll (Farver et al., 2006b) und mit Hilfe von F_v -Fragmenten und Affinitätschromatographie (Kleymann et al., 1995). Für „chloridfreie“ Oxidase wurden die chloridhaltigen Salze für die Aufreinigung durch Sulfat ersetzt (Brandt et al., 1989). Mutationen in den COX-Genloci wurden wie beschrieben durchgeführt (Pfitzner et al., 1998). Rinderherzoxidase in seiner chloridfreien Form wurde von Prof. Brandt (Zentrum der Biol. Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt) zur Verfügung gestellt, die ba_3 -Oxidase aus *Thermus thermophilus* von Dr. Soulimane (Departm. Chem. Environ. Sciences, University of Limerick, Ireland).

Die Aktivität der COX enthaltenden Proteoliposomen (COV) und die so genannte *RCR* (*respiratory control ratio*) wurden in 20 mM HEPES (pH 7,3) und 50 mM KCl gemessen (Müller et al., 1986). Als Substrat wird Cytochrom *c* aus Pferdeherz (*Sigma*) verwendet, das zuvor mit Dithionit reduziert wurde. Überschüssiges Reduktionsmittel wird über einer PD-10 Säule (*Amersham*) abgetrennt. Die Oxidation des Cytochrom *c* aufgrund der Aktivität der COX kann spektrometrisch bei 550 nm verfolgt werden. Die Proteoliposomen werden durch Zugabe von 1,1 μM Valinomycin (*Sigma*) und 2,2 μM CCCP (Carbonyl-Cyanid-3-ChloroPhenylhydrazon, *Sigma*) entkoppelt. Die *RCR* bezeichnet das Verhältnis der entkoppelten Cytochrom *c*-Oxidationsrate gegenüber der kontrollierten. Die Umsatzrate lässt sich mit dem differentiellen (reduziert-oxidiert) Extinktionskoeffizienten für das Cytochrom *c* bestimmen ($\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 19 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Die Konzentration der COX wird anhand von Redox-Differenzspektren bestimmt. Die COX wird hierzu vollständig mit Ferricyanid oxidiert und nach Aufnahme eines sichtbaren Spektrums mit Dithionit (1 M in 20 mM Natriumpyrophosphat, pH 8,0) reduziert. Die Konzentration lässt sich aus dem Redox-Differenzspektrum bestimmen ($\Delta\epsilon_{606-621\text{nm}} = 24,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.1.3. Die Quinol-Fumarat Reduktase

Die QFR aus *Wolinella succinogenes* wurde von Dr. Lancaster (Abt. Mol. Membr., MPI für Biophysik) bereitgestellt (Mileni et al., 2005). Die Aktivität der QFR-Liposomen kann spektrometrisch anhand der Menaquinoloxidation verfolgt werden. Für die Messungen ohne Phylloquinon in den Proteoliposomen wird das wasserlösliche Dimethylmenaquinon (DMN) verwendet. Dieses muss zuvor jedoch reduziert werden, was auf zwei Wegen erfolgen kann. DMN lässt sich durch Natriumborhydrid reduzieren, die QFR-Aktivität wird hier durch

die Zunahme bei 270 nm verfolgt ($\Delta\epsilon_{\text{DMN-DMNH}_2}^{270\text{nm}} = 13,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Alternativ kann auch ein enzymatisches System verwendet werden, das DMNH_2 *in situ* erzeugt. Die DT-Diaphorase (*Sigma*) katalysiert die Reduktion von DMN durch NADH. Die Aktivität wird hier anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm verfolgt, die der Konzentrationsabnahme von NADH entspricht ($\Delta\epsilon_{\text{NADH-NAD}^+}^{340\text{nm}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). In einem enzymatischen Assay wird 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, verwendet. Die Konzentration an DMN beträgt 120 μM , an NADH 360 μM und 0,02 mg/ml für die DT-Diaphorase. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 1 mM Fumarat gestartet. Die Bestimmung der QFR-Aktivität muss unter anaeroben Bedingungen aufgrund der schnellen Oxidation des DMNH_2 durch Sauerstoff erfolgen. Die Konzentration der QFR kann spektrometrisch in Redox-Differenzspektren anhand der α -Banden der Hämgruppen bestimmt werden ($\Delta\epsilon_{563-575\text{nm}} = 23,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.1.4. Der bc_1 -Komplex

Der bc_1 -Komplex aus *S.cerevisiae* wurde von Dr. Hunte (Abt. Mol. Membr., MPI für Biophysik) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Aktivität der Proteoliposomen kann mittels der Reduktion von Cytochrom *c* bei 550 nm verfolgt werden. Als Substrate werden Cytochrom *c* aus Pferdeherz und Decylubiquinol (DBH_2 ; *Sigma*) verwendet. Das Quinon muss vorher durch Dithionit reduziert und anschließend in einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden (Palsdottir and Hunte, 2003). Es kann reduziert in Ethanol mit 10 mM HCl bei -20°C gelagert werden. Die Konzentration des Komplexes wird anhand von Redox-Differenzspektren bestimmt, entweder über das Häm c_1 ($\Delta\epsilon_{553-540\text{nm}} = 17 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) oder die beiden *b*-Häme ($\Delta\epsilon_{562-575\text{nm}} = 28,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.2. Messmethoden

2.2.1. Elektrometrische Messungen

Versuchsaufbau Elektrometrische Messungen wurden an einer *Black Lipid Membrane* (BLM) gemessen. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt. Die Messküvette besteht aus Teflon, ihre beiden Kompartimente werden in den Versuchen mit 1,4 ml Puffer befüllt. Diese sind durch die BLM getrennt, die über einer kleinen Öffnung mit einem Durchmesser von 0,8 mm gespannt wird. Die Küvette ist an den Seiten mit Quarzfenstern abgeschlossen, die Lichteintritt auf die Membran erlauben. Die Lösungen in der Küvette können durch zwei Magnetrührer gemischt werden. Die Küvette wird in einen thermostatisierbaren Messingblock eingesetzt, der sich in einem verschließbaren Faradaykäfig befindet, dessen Atmosphäre durch Gasaustausch kontrolliert werden kann. Die Spannung über der Membran, die zu messende Größe, wird durch platiniierte Platinelektroden abgegriffen. Eine Elektrode ist geerdet, die andere führt zum Eingang eines Spannungsverstärkers ($200\times$) mit einem Operationsverstärker (3554 *Burr Brown*) als aktives Element. Das Spannungssignal wird $5\times$ nachverstärkt (Model 560, *Stanford Research Systems*), mit einem Tiefpass und 6 dB pro Oktave gefiltert (1 MHz) und auf einem digitalen Speicheroszilloskop aufgezeichnet (Integra 10 oder Pro10, *Nicolet*). Der Messaufbau ist gegenüber mechanischen Erschütterungen durch einen schwingungsgedämpften Tisch geschützt.

Für die Bestimmung der Leitfähigkeit und der Kapazität der Membran kann das Signal durch einen Schalter auch in einen Strom-Spannungswandler eingespeist werden (OPA111,

2. Material und Methoden

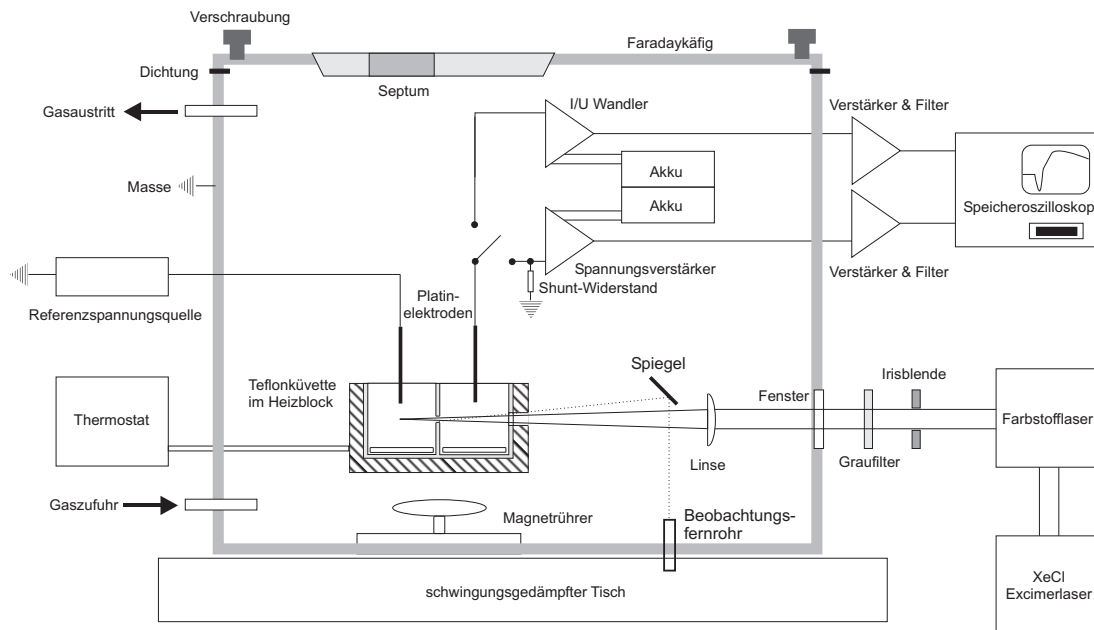


Abbildung 2.1.: Messaufbau für elektrometrische Messungen an der *BLM*. Abbildung aus Ruitenber (2001) mit Abweichungen, Erläuterungen im Text.

Burr Brown), der das Signal $10^7 \times$ verstärkt. Das Ausgangssignal wird $100 \times$ nachverstärkt und mit 300 Hz gefiltert. Beide Vorverstärker werden durch zwei 12 V Bleiakkus betrieben, die sich ebenfalls innerhalb des Faradaykäfigs befinden. Die Membran kann über einen kleinen Umlenkspiegel und Fernrohr optisch beobachtet werden.

Für die Blitzlichtanregung steht ein optisches System zur Verfügung. Ein XeCl-Excimerlaser (MINex oder LEXtra, *Lambda Physik*) pumpt einen Farbstofflaser (RDP-1, *Radiant Dyes Laser Accessoires*) mit Coumarin 2 als Farbstoff. Der Laserpuls besitzt eine Dauer von 10 ns und eine mittlere Wellenlänge von 450 nm. Für Messungen bei 308 nm wurde der Excimerlaser direkt verwendet, bei 343 nm als Farbstoff PTP und bei 480 nm Coumarin 102. Das Licht des Laserblitzes trifft auf eine Irisblende, die über eine Linse auf die Membran abgebildet wird. Die Intensität des Blitzes wird mit Graufiltern auf $100\text{--}150 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf der Lipidmembran abgeschwächt. Dies wird mit einem Energiemessgerät vor jedem Experiment überprüft (NOVA Messgerät mit PE25 Messkopf, *Ophir Optronics*).

Versuchsdurchführung Nachdem die Küvette sorgfältig mit Ethanol und Hexan gereinigt worden ist, wird das Küvettenloch zunächst mit einer Lipidlösung aus 0,5% Diphytanoylphosphatidylcholin (PC) in Hexan imprägniert. Dazu werden 5 μl der Lösung vorsichtig mit einer Pipette um und im Loch gleichmäßig verteilt. Nach Verdunsten des Lösungsmittels kann die Küvette mit dem Puffer befüllt und anschließend die beiden Rührmagnete blasenfrei eingesetzt werden. Die Küvette wird in die Apparatur eingebaut und die Elektroden an die Eingänge angeschlossen. Bei anaeroben Experimenten findet der Gasaustausch vor der Befüllung mit Puffer statt: Die Apparatur wird mit der Ölpumpe entgast und anschließend mit Argon befüllt. Dieser Vorgang wird zwei Mal durchgeführt. Danach wird für mindestens 20 min weiter mit Argon gespült (ca. 500 ml/min). Nun wird mit Argon gesättigt.

ter Puffer zugefügt, der zusätzlich 10 mM Glukose, 40 mg/ml Glukose-Oxidase (*Fluka*) aus *Aspergillus niger* und 25 mg/ml Katalase aus Rinderleber (*Sigma*) enthält. Dieses Enzymsystem verbraucht residuellen Sauerstoff durch Oxidation der Glukose zur Glukonsäure. Das dabei entstehende H_2O_2 wird von der Katalase disproportioniert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Küvette nun befüllt, eingebaut und der elektrische Kontakt zum Messsystem hergestellt. Nun wird die *BLM* gezogen: Hierzu wird ein wenig einer Lösung aus 1,5% PC und 0,025% Octadecylamin (*Riedel-De-Haen*) in Dekan unter das imprägnierte Loch gebracht. Die Ausbildung der *BLM* wird optisch verfolgt, bis die Membran sich schwarz entfärbt hat. Die elektrischen Eigenschaften der Membran werden mit Hilfe der Referenzspannungsquelle gemessen. Für die Bestimmung der Kapazität wird eine Sägezahnspannung von 10 mV/s angelegt und aus der Rechteckantwort des Stromsignals bestimmt. Die Leitfähigkeit wird aus der stationären Komponente des Stromsignals nach einem Spannungssprung gemessen. Die Güte der Membran wird anhand von Literaturwerten beurteilt ($C_m = 0,4 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ und $G_m = 4 \text{nS} \cdot \text{cm}^{-2}$, Janko and Benz, 1977). Nach Überprüfung der Membran gibt man zum lichtabgewandten Kompartiment 30 μl der Proteoliposomenlösung und lässt sie unter Rühren eine Stunde anlagern.

Am Ende der Inkubationszeit werden die elektrischen Artefakte aufgenommen, die durch das Auftreffen des Laserblitzes auf die Membran entstehen. Anschließend erfolgt die Substratzugabe der lichtaktivierbaren Substanz. Die organometallischen Rutheniumkomplexe wie Rubpy, die im angeregten Zustand sowohl stark oxidierend (1 V) oder stark reduzierend (-1 V) wirken (Roundhill, 1994), benötigen zusätzlich einen Elektronendonator oder -akzeptor, der die Rutheniumsubstanz wieder reoxidiert oder rereduziert (s. Abb. 2.2): Blitzlichtanregung in Gegenwart von Rubpy (120 μM) führt in Gegenwart von 300 μM Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) zur schnellen Photoreduktion von Cu_A der COX (Nilsson, 1992) mit einer Ausbeute von 1-2%. EDTA reduziert nun den oxidierten Rutheniumkomplex und zerfällt dabei in einer irreversiblen Reaktion. Für die Photooxidationsexperimente am bc_1 -Komplex wird hingegen Paraquat (1 mM) verwendet, das den reduzierten Rutheniumkomplex oxidiert. Der angeregte Rutheniumkomplex führt hier zur schnellen Oxidation des Cytochrom c_1 im bc_1 -Komplex (Sadoski et al., 2000). Die positiv geladenen Rutheniumkomplexe binden bei niedriger Ionenstärke fest an die Bindungsstelle des Cytochrom c und sorgen so für einen physiologischen Elektronenfluss, der nun zeitlich in hoher Auflösung beobachtet werden kann.

Elektrische Eigenschaften Die elektrischen Eigenschaften des Messaufbaus sind bereits gut untersucht und beschrieben worden (Bamberg et al., 1979; Borlinghaus et al., 1987). Abbildung 2.3(a) zeigt eine schematische Darstellung der Messanordnung, deren Ersatzschaltbild in Abbildung 2.3(b) zu sehen ist und die kapazitive Kopplung zwischen der *BLM* und den Proteoliposomen beschreibt.

Die Analyse des Ersatzschaltbildes wird mit der Knotenregel $I_{COX} = I_b + I_p$ verfolgt (s. Holz, 1990). Diese liefert den Zusammenhang zwischen dem von der COX erzeugten Strom I_{COX} und der zeitabhängigen gemessenen Spannung $U_{gem}(t)$. Die Amplitude der Spannungsantwort wird durch die Systemeigenschaften der Stützmembran und der Proteoliposomen moduliert (s. Abbildung 2.2.1). Bei Spannungsmessungen mit einem hochohmigen Eingang am Spannungsverstärker kann der Serienwiderstand des Messkreises vernachlässigt werden. Ebenso wird die Leitfähigkeit der Stützmembran, die einen sehr geringen Wert ($\approx 50 - 100 \text{ pS}$) besitzt, nicht weiter berücksichtigt. Die COX erzeugt einen Strom,

2. Material und Methoden

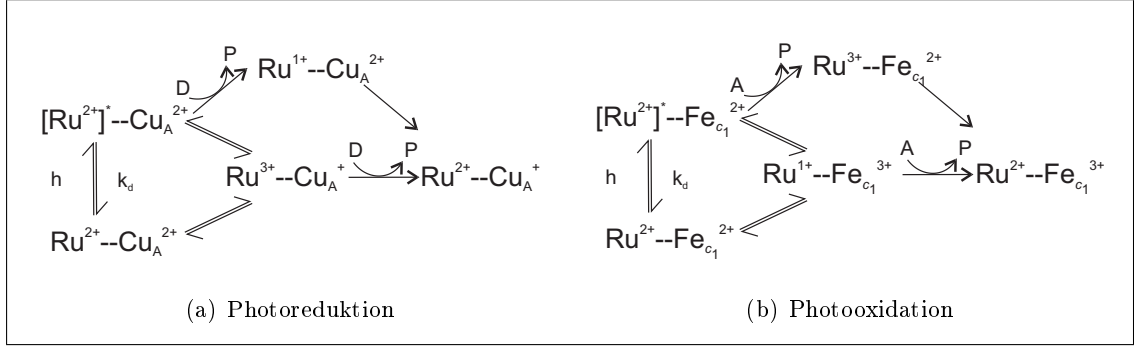


Abbildung 2.2.: Photochemie von Rubpy: In (a) ist die Photoreduktion von Cu_A der COX gezeigt. Der angeregte Zustand des Rutheniumkomplexes kann unproduktiv in den Grundzustand zurückgehen. Sequentielle Reaktionen mit Cu_A und EDTA (D) führen zur gewünschten Photoreduktion. Die Reaktion ist wegen der Zerfallsprodukte von EDTA (P) irreversibel. In (b) ist zum Vergleich die Photooxidation von Cytochrom c₁ aus dem bc₁-Komplex dargestellt. Als Elektronenakzeptor (A) wird Paraquat verwendet, das dadurch in die radikalische Form übergeht.

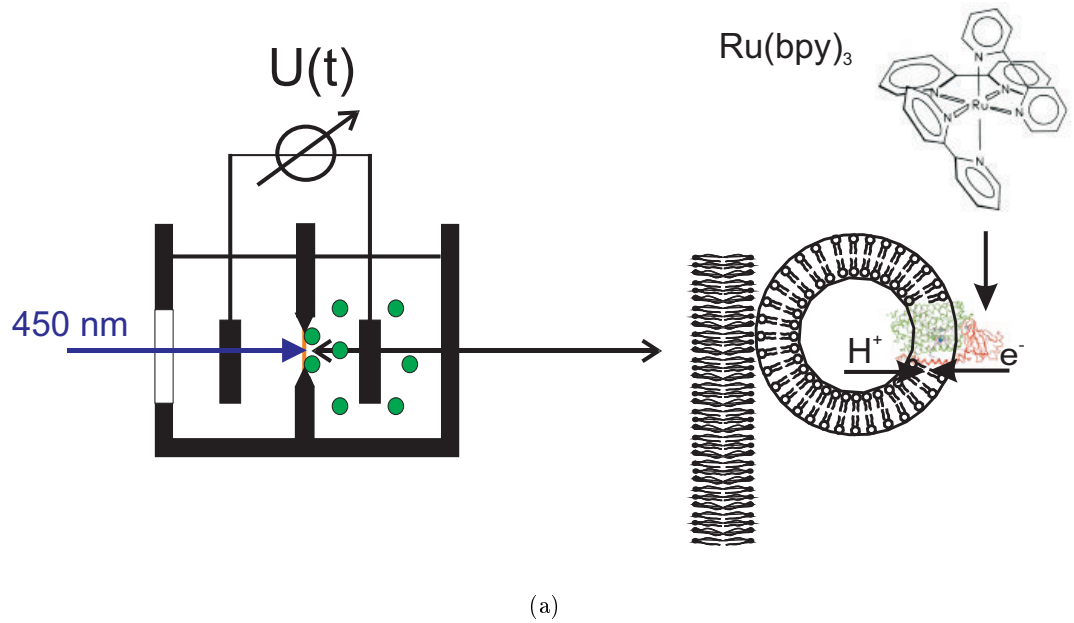
dessen Zeitverlauf mit einer Relaxationszeit τ_0 beschrieben wird $I_{COX} = I_0 \cdot \exp(-t/\tau_0)$. Zusammen mit den Konstanten aus Abbildung 2.3(b), sowie der Stromdichtenamplitude $j_0 = I_0/(\gamma \cdot A)$ erhält man für die gemessene Spannung:

$$U_{gem}(t) = \sum_{i=0}^2 U_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (2.1)$$

$$\begin{aligned} U_0 &= \frac{j_0 \cdot \gamma}{(1 - \gamma) \cdot C_m + C_p} \cdot \frac{\tau_1 \cdot \tau_2 \cdot \tau_0}{(\tau_1 - \tau_0) \cdot (\tau_2 - \tau_0)} \\ U_1 &= \frac{j_0 \cdot \gamma}{(1 - \gamma) \cdot C_m + C_p} \cdot \frac{\tau_1 \cdot \tau_2 \cdot \tau_0}{(\tau_0 - \tau_1) \cdot (\tau_2 - \tau_1)} \\ U_2 &= \frac{j_0 \cdot \gamma}{(1 - \gamma) \cdot C_m + C_p} \cdot \frac{\tau_1 \cdot \tau_2 \cdot \tau_0}{(\tau_0 - \tau_2) \cdot (\tau_1 - \tau_2)} \end{aligned} \quad (2.2)$$

Der erste Term in 2.1, $U_0(t)$, ist der Ausdruck für das aktive Signal aufgrund der von der COX generierten Ladungsverschiebungen und dessen zeitliche Ableitung ist proportional zum erzeugten Strom $I_{COX} \propto -dU_0(t)/dt$ (s. z.B. Borlinghaus et al., 1987). Dieser lässt sich mit der von der COX über die Proteoliposomen erzeugten Spannung U_{COX} und der Amplitudenverfälschung aufgrund der Systemzeitkonstanten f_{sys} beschreiben:

$$\begin{aligned} U_0(t) &= U_0 \cdot e^{-t/\tau_0} = U_{COX}(t) \cdot f_{sys} \\ U_{COX}(t) &= \frac{j_0 \cdot \gamma \cdot \tau_0}{(1 - \gamma) \cdot C_m + C_p} \cdot e^{-t/\tau_0} \\ f_{sys} &= \frac{\tau_1 \cdot \tau_2}{(\tau_1 - \tau_0) \cdot (\tau_2 - \tau_0)} \end{aligned} \quad (2.3)$$



A	Gesamtfläche der <i>BLM</i>
γ	Bedeckungsgrad
A_b	bedeckte Fläche der <i>BLM</i> ($\gamma \cdot A$)
A_u	unbedeckte Fläche der <i>BLM</i> ($(1 - \gamma) \cdot A$)
G_m	spez. Leitfähigkeit der <i>BLM</i>
G_p	spez. Leitfähigkeit der COV
C_m	spez. Kapazität der <i>BLM</i>
C_p	spez. Kapazität der COV
I_{COX}	von der COX erzeugter Strom
I_b, I_p	Strom über die <i>BLM</i> und die COV
U_b, U_p	Spannung über die <i>BLM</i> und die COV
U_{gem}	gemessene Spannung
$1/G_s$	Serienwiderstand des Messkreises

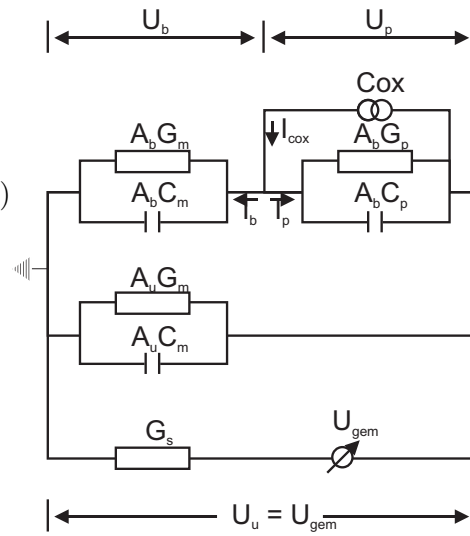


Abbildung 2.3.: Messanordnung an der *BLM* und deren Ersatzschaltbild: Die an der Messmembran angelagerten Proteoliposomen sind in (a) gezeigt. In (b) ist das entsprechende Ersatzschaltbild eingefügt.

2. Material und Methoden

Die Systemzeitkonstanten τ_1 und τ_2 beschreiben die passive Relaxation des Systems. Sie hängen hierbei in folgender Weise von der Leitfähigkeit der Proteoliposomen und den Kapazitäten der Membransysteme ab, wobei $\bar{C} = \frac{C_m \cdot C_p}{C_m + C_p}$:

$$\begin{aligned} \gamma \rightarrow 1 : \quad & \tau_1 \approx A \cdot R_{sh} \cdot \bar{C} & \tau_2 \approx C_p / G_p \\ \gamma \rightarrow 0 : \quad & \tau_1 \approx A \cdot R_{sh} \cdot C_m & \tau_2 \approx (C_p + C_m) / G_p \end{aligned} \quad (2.4)$$

Die Systemzeitkonstanten bestimmen das Zeitfenster der Messung. Die Näherungen sind für verschiedene Bedeckungsgrade erhalten. Die erste Systemzeit ist im Wesentlichen durch den Shunt-Widerstand ($R_{sh}=1\text{ G}\Omega$, s.Abb. 2.1 auf S. 28) und die Membrankapazität bestimmt. Die zweite Systemzeitkonstante wird hingegen durch die Eigenschaften der Proteoliposomen geprägt. Die Zeitkonstanten liegen im Bereich von $\tau_2 = 200 - 400\text{ ms}$ und $\tau_1 = 2 - 3\text{ s}$, während die untere und hier entscheidende Grenze der Anstiegszeit durch die Messelektronik bestimmt wird. Sie liegt bei 1-2 μs .

Die zeitabhängigen Signale wurden mit einer Summe von Exponentialfunktionen beschrieben. Die Relaxationszeiten und Amplituden umfassen die Kinetik der einzelnen Übergänge und die Konzentrationen der Intermediate. Diese Parameter wurden aus einer nicht-linearen Kurvenanpassung erhalten (Marquardt-Levenberg Algorithmus). Für die Analyse wurde entweder ORIGIN 7.5 (*Microcal*) oder MATHCAD 12 (*Mathsoft*) verwendet.

2.2.2. Spektrometrische Messungen

Statische Messungen wurden mit einem Spektrophotometer (*Hitachi* U-3000) aufgenommen. Zeitaufgelöste Messungen wurden an einer Blitzlichtapparatur gemessen. Der Anregungsstrahl des Farbstoff- oder Excimerlasers (5-10 mJ) trifft im rechten Winkel zum Messlicht auf eine Quarzküvette, die in einer verdunkelten Messkammer eingesetzt ist. Das Messlicht stammt entweder von einem durchstimmbaren He-Ne Dauerstrichlaser (Laser2000, *Research Electro-Optics*) oder einer 75 W Xenon-Kurzbogenlampe (*Zeiss*). Um auf Intensitätsfluktuationen zu korrigieren, wird vor Eintritt in die Messprobe ein Referenzstrahl ausgekoppelt. Die Lichtintensität wird von einer Photodiode aufgenommen und deren Photostrom verstärkt (PMT-4 Amplifier, *Scientific Instruments*). Das nachverstärkte und gefilterte (SR 560, *Stanford Research Systems*) Signal wird von einem digitalen Speicheroszilloskop (Integra 10, *Nicolet*) aufgenommen.

^1H -NMR Spektren wurden an einem 250 MHz Spektrometer (*Bruker* AM 250) am Lehrstuhl für Organische Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Frankfurt) aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan (TMS) referenziert. Massenspektrometrische Bestimmungen sowie Elementaranalysen wurden von der Service-Abteilung der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Frankfurt) durchgeführt.

FT-IR Spektren an der Cytochrom *c* Oxidase wurden mit Hilfe von Prof. Rich am *University College London* (*Department of Biology, Glynn Laboratory of Bioenergetics*) aufgenommen. Das Vorgehen folgt der Versuchsanleitung in Rich and Breton (2001). FT-IR Differenzspektren am *caged* Fumarat (photolysiert *minus* unphotolysiert) wurden am Institut für Biophysik der Universität Frankfurt (Prof. Mäntele) an einem *Bruker* IFS 25 aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Die Cytochrom c Oxidase

3.1.1. Der O→E-Übergang

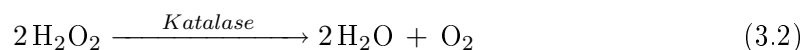
Obwohl der reduktive Teil des katalytischen Zyklus schon anhand elektrischer Messungen untersucht worden ist (Ruitenbergh et al., 2000, 2002), bestehen noch Differenzen bezüglich einer Protonenaufnahme ausgehend vom oxidierten Enzym (Verkhovsky et al., 2001a). Mechanistisch stellt die Kopplung von Häm *a*-Reduktion mit einer Protonenaufnahme einen wichtigen Punkt und wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen den verschiedenen Modellen dar. Hier sollen mit Hilfe der *BLM*-Methode der Einfluss verschiedener Faktoren auf das Ausmaß und die Kinetik der Protonenaufnahme im O→E-Übergang näher beleuchtet werden:

- Führen die experimentellen Bedingungen bei den elektrometrischen Messungen zu einer Population an teilreduzierter COX, die für die beobachtete Protonenaufnahme verantwortlich ist, wie von Verkhovsky et al. (2001a) angeführt?
- Weist die Protonenaufnahme in ihrem Ausmaß oder in ihrer Kinetik eine pH-Abhängigkeit auf?
- Besitzt Chlorid bzw. ein Enzym, das Chlorid gebunden hat, einen Einfluss auf die Ausbildung der Protonenphase im O→E-Übergang?

Insbesondere die letzten beiden Fragestellungen sind mit der Problematik von Heterogenitäten in den Enzympräparationen der COX verbunden. Die Charakterisierung abseits der elektrometrischen Messungen wird für die Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* in einem anderen Abschnitt behandelt (s. Abschnitt 3.1.5 auf S.48).

Spektroskopische Kontrolle zum Reduktionsgrad der isolierten Cytochrom c Oxidase

Um den Reduktionsgrad der Hämgruppen sichtbar zu machen, wurden spektroskopische Untersuchungen unter denselben Bedingungen wie an der *BLM* durchgeführt: Nach Ent- und Begasen mit Argon wird Glukose zusammen mit Katalase und Glukose-Oxidase zum Puffer zugesetzt, um noch vorhandenen molekularen Sauerstoff zu reduzieren:



Reduzierte Häme können leicht im Spektralbereich zwischen 575-630 nm, der so genannten α -Bande, identifiziert werden. Abbildung 3.1(a) zeigt deren Entwicklung sowie die entsprechende Kontrolle in Abwesenheit von COV (Abb. 3.1(b)). Während einer 90 minütigen

3. Ergebnisse

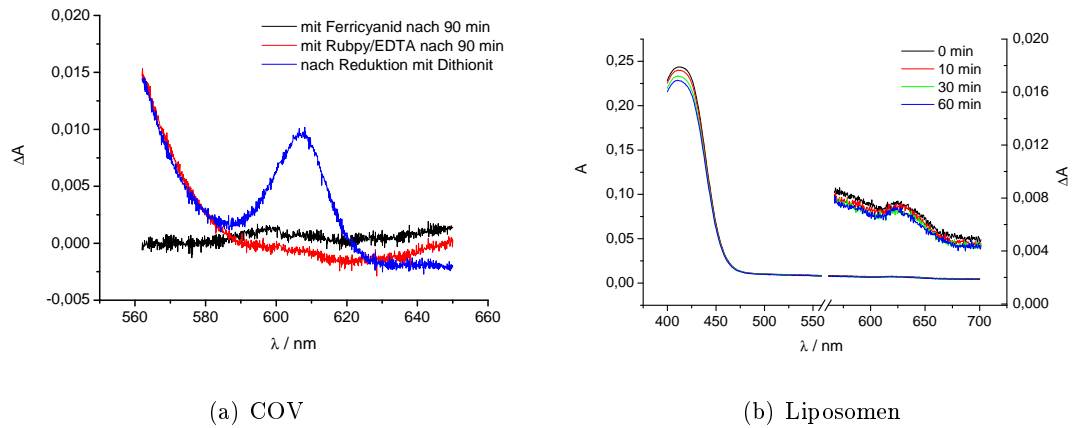


Abbildung 3.1.: Spektroskopische Untersuchungen zum Reduktionsgrad der Hämgruppen: (a) COV (0,4 μ M Cytochrom *c* Oxidase) werden in 50 mM HEPES (pH 7, 4), 2 mM Glukose, 25 μ g/ml Katalase, 40 μ g/ml Glukose-Oxidase und 200 μ M Ferricyanid inkubiert. Danach werden 80 μ M Rubpy und 300 μ M EDTA zugegeben und zuletzt Dithionit zur quantitativen Reduktion der COX. Es sind die Differenzspektren mit Referenz zum Spektrum vor der Ferricyanidzugabe zu sehen. (b) Absolutspektren einer Probe mit leeren Liposomen ohne COX zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ferricyanidzugabe. Die rechte Achse zeigt eine Vergrößerung des Spektralbereichs von (b).

Inkubation von COV ist keine Reduktion der prosthetischen Hämgruppen in Anwesenheit des Sauerstoff verbrauchenden Enzymsystems sowie von Ferricyanid zu erkennen. Auch in Anwesenheit von Rubpy und EDTA ändert sich dieser Zustand nicht.

Glukose-Oxidase ist ein Flavoprotein (Pazur and Kleppe, 1964), das verschiedene Substrate mit unterschiedlicher Effizienz reduzieren kann (Wohlfahrt et al., 2004). Ferricyanid wird tatsächlich langsam von Glukose-Oxidase reduziert (Verkhovsky et al., 2001a), wie in Abb. 3.1(b) zu sehen ist. Nach 60 min werden unter den Versuchsbedingungen für elektrische Messungen ca. 7% Ferricyanid reduziert. Berücksichtigt man das Normalpotential des Ferricyanid/Ferrocyanid-Systems von $E'_0 = 0,41$ V (O'Reilly, 1973), so herrschen trotz der Aktivität der Glukose-Oxidase oxidative Bedingungen für die Cytochrom *c* Oxidase, deren Hämgruppen Normalpotentiale von $E_{a_3}^0 = 0,24$ V und $E_a^0 = 0,42$ V besitzen (Hellwig et al., 1999a). Aus der Nernst-Gleichung ergibt sich damit, dass unter Einstellung des Gleichgewichts maximal $\sim 10\%$ von Häm *a* reduziert vorliegen. Experimentell wurde gezeigt, dass Ferricyanid die Cytochrom *c* Oxidase im E-Zustand reoxidieren kann (Mitchell et al., 1992a). Daher kann die Cytochrom *c* Oxidase in einem oxidierten Zustand angenommen werden.

Auch andere Gründe sprechen für einen definierten Ausgangszustand des O \rightarrow -Übergangs bei den elektrischen Messungen: Für die Anwesenheit der Protonenphase ist es unerheblich, ob die Messungen unter aeroben oder anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Im aeroben Fall findet keine Reduktion von Ferricyanid durch Glukose statt. Auch die Zugabe von Ferricyanid ist nicht immer erforderlich, obwohl manche Präparationen von Proteoliposomen auch eine langsame Millisekundenphase in ihrer Spannungsantwort besitzen. Diese lässt sich durch Ferricyanid inhibieren und stammen von einer Enzymfraktion im E-Zustand.

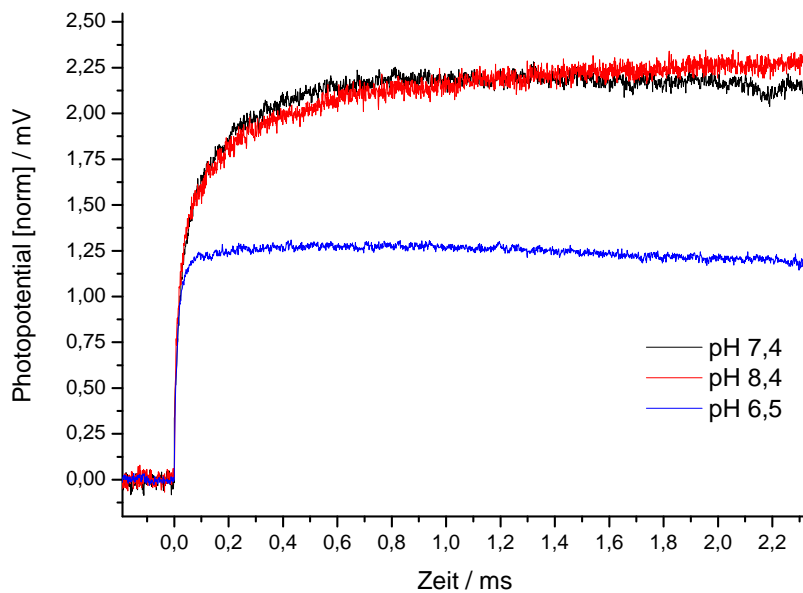


Abbildung 3.2.: pH-Abhängigkeit des O→E-Überganges: COV derselben Präparation wurden über Nacht bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Für pH 6,5 wurde 50 mM Bistris verwendet, für pH 8,4 50 mM Tris/HCl. Die Spannungsantworten wurden auf die schnelle Phase normiert.

Inkubation bei niedrigem pH

Die Inkubation der COX bei niedrigem pH-Wert führt beim Rinderherzenzym zur so genannten langsamen Form. Hier soll der Einfluss einer erhöhten Protonenkonzentration auf die bakterielle COX mit elektrometrischen und spektroskopischen Methoden untersucht werden. Bisher wurde dieser für das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* noch nicht beschrieben. Insbesondere das Verhalten der Protonenphase beim O→E-Übergang bei niedrigem pH-Wert war hier von Interesse.

Tatsächlich zeigt die langsame Phase der Spannungsantwort eine Abhängigkeit vom pH. Inkubiert man COV bei pH 6,5 über mehrere Stunden, verschwindet sie und nur noch die schnelle Phase ist zu erkennen (siehe Abb.3.2).

In einem weiteren Experiment wird der Zeitverlauf dieser Abnahme betrachtet: Die Anlagerung an die BLM erfolgt bei pH 6,5. In Abbildung 3.3 ist der relative Beitrag der Protonenphase zur Gesamtamplitude aufgetragen. Während beim ersten Anregungsblitz nach 60 min noch eine Phase mit einer Zeitkonstante von 299 μ s anwesend ist, fällt ihr Anteil mit fortschreitender Zeit. Nach 330 min liegt nur noch die schnelle Elektronenphase vor.

Die Abnahme der Protonenphase folgt einem exponentiellen Zeitverlauf mit einer Zeitkonstante von 120 min (s. Abb.3.3(b)). Der Ordinatenschnittpunkt liegt bei 0,42 und stimmt somit sehr gut mit den Messungen ohne Inkubation bei pH 6,5 überein (Ruitenberget al., 2000). Der Einfluss der pH-Inkubation auf die Zeitkonstante ist hingegen weniger deutlich. In den meisten Experimenten schwankt die Zeitkonstante für die Protonenphase

3. Ergebnisse

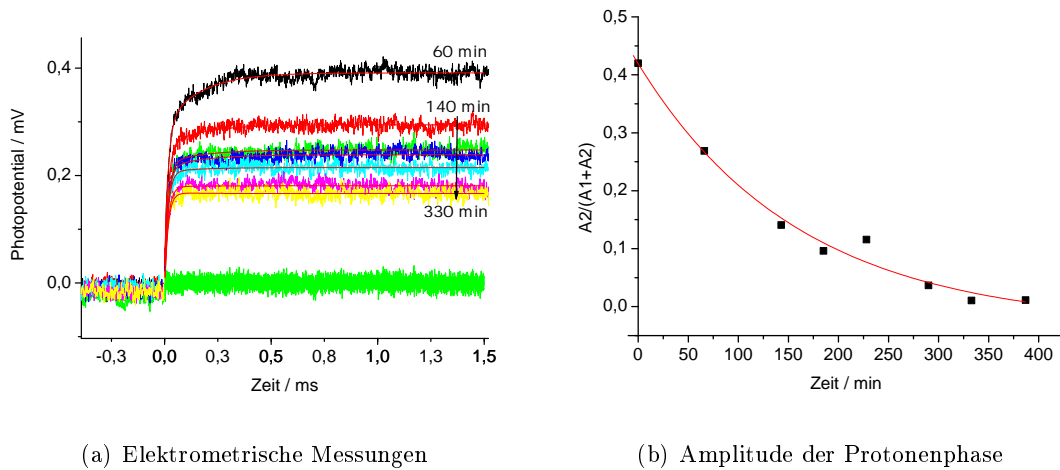


Abbildung 3.3.: pH-Inkubation: COV wurde zu 50 mM Bistris, pH 6,5, zugegeben und eine Stunde angelagert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Spannungsantworten nach Laserblitzanregung aufgenommen. In (a) sind die kinetischen Daten zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten zu sehen, sowie in Rot die entsprechenden Kurven aus einem globalen Fit mit einer zweieponentiellen Funktion und in Grün die Residuen aus dem Fit. In (b) ist der relative Anteil an der Gesamtamplitude der langsamen Phase aufgetragen (siehe Text).

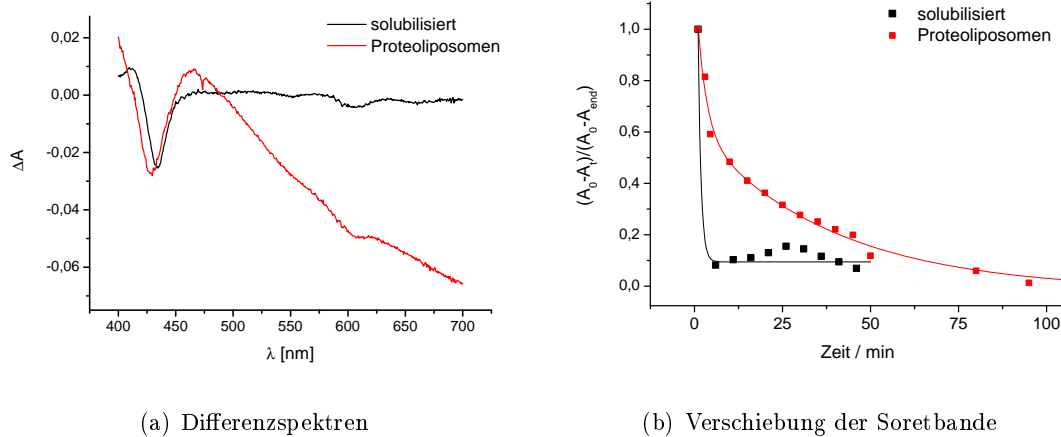
ohne eindeutige Tendenz.

Auch in spektroskopischen Messungen lässt sich der Einfluss des pH-Wertes auf die COX beobachten. Das Maximum der Soretbande verschiebt sich nach einem pH-Sprung auf einen niedrigeren Wert zu kürzeren Wellenlängen, wie in Abbildung 3.4 dargestellt ist. Ein ähnliches Verhalten ist schon zuvor für das Rinderherzenzym beobachtet worden (Papadopoulos et al., 1991). In den Differenzspektren für die Proteoliposomen ist darüber hinaus noch eine Hintergrundabsorption über den gesamten spektralen Bereich zu beobachten. Diese findet sich auch bei Kontrollexperimenten mit leeren Liposomen und stammt wahrscheinlich aus einer Trübung, die durch einen Ausfall oder eine Aggregation der Liposomen bei niedrigerem pH-Wert herbeigeführt wird. Die Änderungen für das solubilisierte Enzym sind vollständig reversibel und schnell. Schon nach Aufnahme des ersten Spektrums nach dem pH-Sprung haben sich die Änderungen in der Soretbande manifestiert.

Im Gegensatz hierzu verlaufen diese in der Probe mit den Proteoliposomen langsamer. Der Zeitverlauf lässt sich mit zwei Zeitkonstanten beschreiben, deren Amplituden ungefähr gleich stark zu der Gesamtänderung des Spektrums beitragen ($\tau_1 = 2,5$ min und $\tau_2 = 40$ min). Die Änderungen gehen nicht einher mit einer veränderten Cyanidbindungskinetik, die indikativ für den Übergang in die langsame Form der COX ist (s. hierzu Abschnitt 3.1.5 auf S.50). Auch gibt es Unterschiede in dem Zeitverlauf für die Abnahme der Protonenphase in den elektrometrischen Messungen und für die Lage der Soretbande in den spektroskopischen Messungen.

Einfluss von Chlorid

Terminale Oxidasen reagieren mit Halogeniden (Moody et al., 1998) und beeinflussen ihre Reaktivität gegenüber kleinen, an das binukleare Zentrum bindenden Molekülen (Giuffrè



(a) Differenzspektren

(b) Verschiebung der Soretbande

Abbildung 3.4.: Entwicklung der Soretbande nach pH-Sprung von pH 7,4 auf pH 6,4: (a) Differenzspektren des Spektrums nach 120 min zu dem vor dem pH-Sprung. (b) Zeitlicher Verlauf der Verschiebung der Soretbande. Für das solubilisierte Enzym wurden die Werte für 433 nm und für die Proteoliposomen bei 429 nm aufgetragen. Die Konzentrationen betrugen $4 \mu\text{M}$ für die solubilisierte und ca. $3 \mu\text{M}$ für die rekonstituierte COX. Die Spektren wurden in einem Puffer aus 25 mM HEPES und 25 mM Bistris aufgenommen, der pH wurde durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure geändert und nach den Experimenten gemessen.

et al., 1998). Es ist weiterhin gezeigt worden, dass die komplette Reduktion der Chlorid gebundenen Form im Gegensatz zur ungebundenen Form zu einer verminderten Aufnahme von Protonen (1,4 *vs.* 2,28) führt (Forte et al., 2002): Die Anwesenheit von Chlorid vermindert die Anzahl der Protonierungsstellen in der COX. In den elektrometrischen Messungen würde dies zu einer Abnahme der Amplitude der Protonenphase führen und könnte somit ebenfalls die unterschiedlichen Resultate im O→E-Übergang erklären. Daher wurden Protokolle zur Aufreinigung einer chloridfreien Enzympräparation entwickelt (verschiedene Präparationen wurden von K. Budiman & H. Müller vom MPI für Biophysik, Abt. Molekulare Membranbiologie, sowie E. Grell vom MPI für Biophysik, Abt. Biophysikalische Chemie zur Verfügung gestellt). In den elektrometrischen Messungen, die mit diesen Präparationen durchgeführt wurden, konnte kein signifikanter Effekt auf die Protonenphase beobachtet werden. Vorherige Inkubation mit Chlorid oder die Verwendung eines chloridhaltigen Messpuffers zeigten ebenfalls keinen Effekt (Daten nicht gezeigt) und scheinen daher keinen Einfluss auf die Protonenphase im O→E-Übergang zu besitzen. Weitere Effekte von Chlorid werden zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (s. Abschnitt 3.1.4 auf S. 46 und Abschnitt 3.1.5 auf S. 48).

3.1.2. Die Temperaturabhängigkeit des O→E-Übergangs

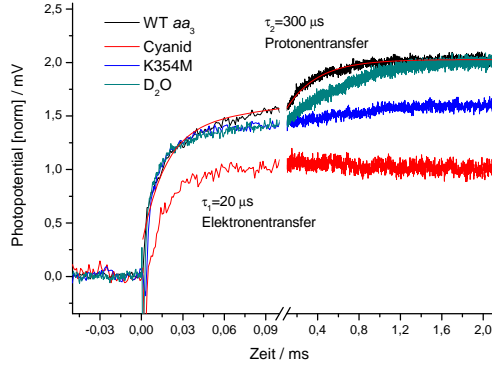
Um einen weiteren Einblick in die Kinetik des Elektronentransfers und der Protonenaufnahme beim O→E-Übergang zu gewinnen, wurde die Temperaturabhängigkeit der elektrometrischen Signale im Bereich von 5°C – 40°C gemessen. Die hierbei gewonnenen kinetischen Parameter lassen sich im Rahmen eines nichtadiabatischen Elektronentransfers diskutieren (Marcus and Sutin, 1985). Weiterhin soll der gegenseitige Einfluss von Elektronen- und Protonentransfer durch Variation der Bedingungen in Form von Zugabe von Cyanid

3. Ergebnisse

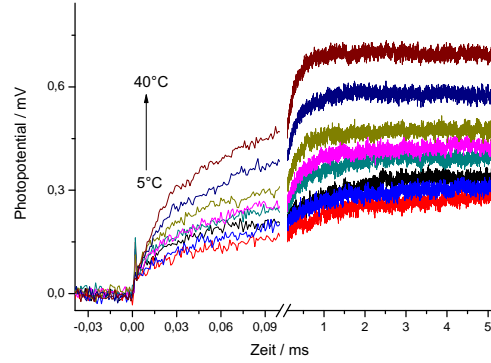
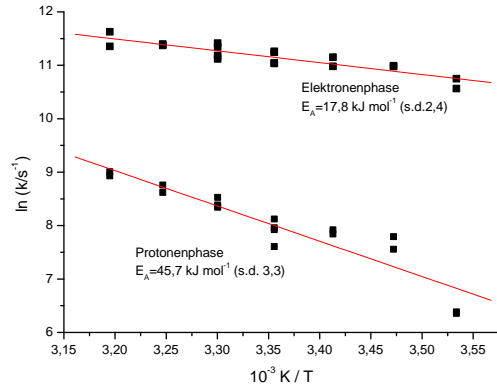
oder D₂O und an der K-Kanalmutante K354M untersucht werden. Abschließend werden noch etwaige Unterschiede durch Vergleichsmessungen der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* und der *ba*₃-Cytochrom *c* Oxidase aus *Thermus thermophilus* betrachtet. Bei der Durchführung muss auf besonders auf einige wesentliche Punkte geachtet werden:

- Temperaturkontrolle: Die Temperatur wurde direkt in der Teflonküvette der *BLM*-Apparatur mit einem Thermocouple (*Keithley*® K-8712) gemessen. Zwischen einzelnen Temperaturpunkten wurde mindestens 15 min für die Temperaturkonstanz äquilibriert.
- pH- und Redoxkontrolle: Für die Temperaturmessungen wurde ein 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4, verwendet. Die Säuredissoziationskonstante $pK_2 = 7,2$ (25 °C) von Phosphorsäure besitzt nur eine geringe Temperaturabhängigkeit, für die ein Wert von $\Delta pK_s/\Delta T = -0,0028 \text{ °C}^{-1}$ bestimmt wurde (Dawson et al., 1986). Dadurch kommt es nur zu geringen Schwankungen im pH-Wert. Wie im Abschnitt 3.1.1 auf S. 33 beschrieben, wird für die Einhaltung des oxidierten Zustandes Ferricyanid als Redoxpuffer zugesetzt.
- Die Temperaturpunkte wurden in zwei Phasen gemessen, einer Aufwärmphase von 25 °C bis 40 °C und einer anschließenden Kühlphase von 25 °C bis 5 °C. Nach Rückkehr zu 25 °C ist das Experiment beendet. Jede Messreihe beinhaltet dadurch einen internen Referenzpunkt, der insgesamt drei Mal durchschritten wird. In manchen Versuchsreihen wurde eine Abnahme der relativen Amplitude der Protonenphase über der Zeit beobachtet. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Zur Auswertung wurden nur Messreihen herangezogen, deren Referenzpunkte nicht um mehr als 30% in ihren relativen Amplituden ($A_2/(A_1 + A_2)$) und ihren Absolutwerten der Relaxationszeiten voneinander abwichen.
- Analysekontrolle: Die Temperaturabhängigkeiten der Zeitkonstanten für den Elektronen- und Protonentransport wurden jeweils aus einer Versuchsreihe bestimmt. Zwischen einzelnen Messreihen kann es in den Absolutwerten zu Schwankungen kommen (s. auch Abschnitt 3.1.5 auf S. 48). Die Werte innerhalb einer Reihe sind hingegen konsistenter und systematische Abweichungen aufgrund von Alter oder Präparation der Proteoliposomen spielen keine Rolle.
- Aktivitätskontrolle: Die Aktivität der COX in Proteoliposomen wurde nach Entnahme einer Probe überprüft, die dieselbe Behandlung hinsichtlich der Temperaturänderungen wie in einem *BLM*-Experiment erfahren hat. In dem gemessenen Temperaturbereich fand hierbei keine signifikante Abnahme der Aktivität statt in Übereinstimmung mit früheren Messungen hinsichtlich der Temperaturstabilität der COX (Haltia et al., 1994).

In Abbildung 3.5 sind einzelne Punkte über die Messungen der Temperaturabhängigkeiten zusammengefasst, Tabelle 3.1 vergleicht die aus einem Arrheniusgraphen erhaltenen Parameter. Aus Abbildung 3.5(a) werden die Effekte der unterschiedlichen Experimentalbedingungen ersichtlich. Prinzipiell wird deutlich, dass diese sich hauptsächlich in der Protonenphase niederschlagen. Die Elektronenphase ist davon nicht betroffen.



(a) Messungen bei 25 °C


(b) Temperaturabhängigkeit der *aa*₃-Oxidase


(c) Arrheniusgraph

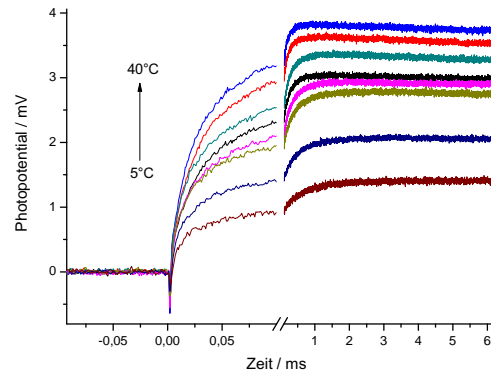

(d) Temperaturabhängigkeit der *ba*₃-Oxidase

Abbildung 3.5.: Zusammenfassung der Temperaturabhängigkeiten der elektrometrischen Messungen am O→E-Übergang. Messungen sind bei 10 mM K-P_i, pH 7, 4, 200 μM Ferricyanid, 300 μM EDTA und 120 μM Rubpy durchgeführt worden. Für die Messungen in D₂O sind während der Rekonstitution und den Messungen die entsprechenden Lösungen mit D₂O verwendet worden, mit pD = pH + 0, 4 (Glasoe and Long, 1960). (a) Einfluss auf die Protonenphase durch Variation der Bedingungen. Die Zeitkonstanten sind für die Messung an der WT-COX bei 25 °C bestimmt worden. Die Amplituden sind auf die Elektronenphase normiert. (b) Beispielhafter Datensatz für die Messung an der *aa*₃-Oxidase. Messungen wurden im Bereich von 5 °C-40 °C in Abständen von 5 °C durchgeführt. (c) Arrheniusgraph der Relaxationszeiten bei den einzelnen Temperaturpunkten. (d) Versuchsreihe an der *ba*₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus*. Die Rubpy-Konzentration betrug bei diesen Messungen 300 μM.

3. Ergebnisse

Wildtyp aa₃-Oxidase In Abbildung 3.5(b) sind die einzelnen Messungen an der Wildtyp aa₃-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* exemplarisch zusammengefasst. Die Gesamtamplitude nimmt mit der Temperatur stark ab. Grund hierfür ist wahrscheinlich die Abnahme der Effektivität der Elektronenübertragung des angeregten Rutheniumkomplexes auf die COX mit der Temperatur, wie sie auch für einfachere Systeme beobachtet wurde (Clark and Hoffman, 1996). Aus der Arrheniusgleichung lassen sich die präexponentiellen Faktoren und die jeweiligen Aktivierungsenergien für den Elektronentransfer und die Protonenaufnahme bestimmen. Der Prozess, verbunden mit der Protonenaufnahme, weist hierbei eine etwa 2-3 Mal höhere Aktivierungsenergie als die des Elektronentransfers auf.

Cyanid Cyanid inhibiert die Aufnahme eines Protons. Die Elektronentransferrate wird hierdurch nur leicht in ihrer Größe beeinflusst. Auch die Aktivierungsenergie ist vergleichbar, bei dem Cyanid inhibierten Enzym etwas geringer ausfallend. Cyanid hält Häm a₃ im oxidierten Zustand, der Einfluss auf die Mittelpunktspotentiale der anderen Kofaktoren ist hingegen nicht ganz geklärt (Hendler and Westerhoff, 1992). Die Verschiebung eines Potentials führt zu einer veränderten Triebkraft für den Elektronentransfer zwischen Cu_A und Häm a, was sich in einer etwas niedrigeren Aktivierungsenergie niederschlägt.

D₂O Die Messungen in D₂O bestätigen den beobachteten Isotopeneffekt auf die Protonenaufnahme im O→E-Übergang (Ruitenberget al., 2000). Er ist nicht sehr stark ausgeprägt und beträgt bei 25°C ungefähr 1,5, eine leichte Temperaturabhängigkeit aufweisend. Während die Aktivierungsenergie für den Protonentransfer in H₂O und D₂O einen vergleichbaren Wert annimmt, schlägt sich der Isotopeneffekt hauptsächlich auf den präexponentiellen Faktor nieder (s. Tab.3.1, $A_H/A_D=63$), was auf einen Tunneleffekt hindeuten könnte (Bell, 1974). Ein größerer kinetischer Isotopeneffekt ist in einzelnen Übergängen, die einen Protonenpumpschritt beinhalten, beobachtet worden (Karpefors et al., 2000b; Salomonsson et al., 2005). Die Aktivierungsenergie des Elektronentransferprozesses ist im Vergleich zu den Messungen in H₂O nicht beeinflusst.

K354M Die K354M-Mutante behindert die Protonenaufnahme über den K-Weg. In Übereinstimmung mit den Literaturangaben findet sich bei dieser Mutante nur eine residuelle Protonenaufnahme mit einer gegenüber dem Wildtyp verkleinerten relativen Amplitude und einer vergrößerten Zeitkonstante ($\tau_2 \approx 600 \mu s$, s.a. Ruitenberget al., 2000; Konstantinov et al., 1997). In manchen Messungen war die Temperaturabhängigkeit dieses Prozesses nicht zu messen, da selbst die Restamplitude mit der Anzahl der Messungen noch weiter abnahm. Die Aktivierungsenergie verringert sich in der Mutante, wohingegen für den Elektronentransfer nur eine kleine Erhöhung festzustellen ist.

ba₃-Oxidase Elektrometrische Messungen an der ba₃-Oxidase sind schon zuvor durchgeführt worden (Kannt et al., 1998b; Siletsky et al., 1999b) und die Verwendung von Rubpy als Elektronendonator gezeigt worden. Die ba₃-Oxidase zeigt beim O→E-Übergang ebenfalls zwei Phasen mit Zeitkonstanten $\tau_1 = 21 \mu s (\pm 5)$ und $\tau_2 = 202 \mu s (\pm 15)$. Im Unterschied zur aa₃-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* beträgt das Verhältnis der relativen Amplituden der Elektronen- zu Protonenphase 2:1. Weiterhin muss bei den elektrometrischen Messungen die Rubpy-Konzentration auf 300 μM erhöht werden, was einen Tribut an den

	Elektronentransfer		Protonentransfer	
	A	E_A	A	E_A
	(s ⁻¹)	(kJ·mol ⁻¹)	(s ⁻¹)	(kJ·mol ⁻¹)
<i>aa</i>₃	10 ^{7,7±0,2}	16,4 (2,8)	10 ^{12,4±0,2}	46,1 (8,4)
Cyanid	10 ^{7,3±0,2}	12,3 (2,1)		
D₂O	10 ^{8,5±0,3}	16,3 (3,4)	10 ^{10,6±0,2}	36,9 (6,2)
K354M	10 ^{8,5±0,1}	20,4 (1,1)	10 ^{8,3±0,2}	28,6 (1,6)
<i>ba</i>₃	10 ^{7,7±0,2}	17,2 (3,1)	10 ^{11,3±0,2}	39,6 (2,9)

Tabelle 3.1.: Aktivierungsenergien E_A und präexponentielle Faktoren A aus der Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeiten des O→E-Überganges. Die Parameter wurden aus der Abhängigkeit der Ratenkonstanten von der Temperatur bestimmt $1/\tau_i = k_i = A \times \exp(\frac{-E_A}{R \cdot T})$, wobei A den präexponentiellen Faktor, E_A die Aktivierungsenergie und R die Gaskonstante mit 8,315 J·K⁻¹·mol⁻¹ darstellen.

größeren Einfluss hydrophober Wechselwirkungen an der Cytochrom *c* Bindungsstelle darstellt (Maneg et al., 2004). Die Aktivierungsenergien aus den Messungen bei verschiedenen Temperaturen (vgl. Abb. 3.5(b) und (d)) sind für die beiden untersuchten Oxidasen vergleichbar: Die Elektronenaufnahme wird in der *ba*₃-Oxidase in einem ähnlichen Prozess durch die Protonenaufnahme elektrostatisch kompensiert. Für eine weiterführende Untersuchung anderer Zwischenzustände mit der *BLM*-Technik ist die *ba*₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* aufgrund ihrer geringen Reaktivität gegenüber exogenen Reduktionsmitteln wie CO oder Wasserstoffperoxid nicht zugänglich, wie es auch zuvor schon gezeigt worden ist (Siletsky et al., 1999b).

Aus Puls-Radiolyse Messungen mit 1-Methylnicotinamid als Elektronendonator für die COX konnte die Elektronenverteilung nach dem O→E-Übergang, sowie die thermodynamischen Parameter dieser Reaktion aus der Temperaturabhängigkeit dieser Reaktion spektroskopisch bestimmt werden (Farver et al., 2006a,b). Mit Hilfe der Gleichgewichtskonstante K lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion, k_f und k_r , des Elektronentransfers berechnen. Aus den Arrhenius-Parametern können anschließend die kinetischen Parameter der Eyring-Gleichung ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger ermittelt werden:

$$\begin{array}{llll}
\text{aus} & \ln k = \ln A + \frac{-E_A}{RT} & \text{und} & \ln k = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln T - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \\
\text{sowie} & \frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_A}{RT^2} & \text{und} & \frac{d \ln k}{dT} = \frac{\Delta H^\ddagger + RT}{RT^2} \\
\text{folgt} & \Delta H^\ddagger = E_A - RT & \text{und} & \Delta S^\ddagger = R \cdot \ln\left(\frac{A \cdot h}{k_B \cdot T}\right) - R
\end{array} \quad (3.3)$$

Tabelle 3.1.2 vergleicht die kinetischen Parameter für den Elektronentransferprozess beim O→E-Übergang aus den elektrometrischen Messungen und den Puls-Radiolyse Messungen für die *aa*₃- und *ba*₃-Oxidase, sowie für die Rinderherzoxidase. Aus den Geschwin-

3. Ergebnisse

	Raten- konstante	(s ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ·mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
<i>P. denitrificans</i> , <i>BLM</i>	k _f	39000 (±6300)	17,6 (±1, 1)	-107 (±5)
	k _r	20000 (±3200)	20,1 (±1, 1)	-104 (±5)
<i>P. denitrificans</i> , <i>Puls-Radiolyse</i> ¹	k _f	20400 (±1500)	22,2 (±1, 2)	-88 (±2)
	k _r	10030 (±800)	24,6 (±1, 3)	-86 (±2)
<i>Th. therm.</i> , <i>BLM</i>	k _f ²	14453 (±1956)	15,3 (±3, 3)	-117 (±10)
	k _r ²	27270 (±3690)	15,5 (±3, 3)	-111 (±10)
<i>Th. therm.</i> , <i>Puls-Radiolyse</i> ³	k _f	3880 (±420)	—	—
	k _r	7320 (±800)	—	—
<i>B. taurus</i> , <i>Puls-Radiolyse</i> ⁴	k _f	13000 (±1200)	11,4 (±0, 9)	-128 (±11)
	k _r	3700 (±300)	13,4 (±1, 0)	-131 (±11)
	Thermodyn. Parameter	K (k _f /k _r)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
	<i>P. denitrificans</i> ¹	2	-2,4 (0,7)	-2,6 (2,4)
	<i>Th. therm.</i>	0,53 ³	-0,45 ⁵	6,6 ⁵
	<i>B. taurus</i> ⁴	3,4	-2 (0,3)	3 (5)

¹Daten aus Farver et al. (2006b)

²unter der Annahme einer temperaturunabhängigen Gleichgewichtskonstante K

³Daten aus Farver et al. (2006a)

⁴Daten aus Farver et al. (2000)

⁵berechnet aus den Werten für ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger

Tabelle 3.2.: Kinetische Parameter für den O→E-Übergang : Die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion $O \rightleftharpoons E$ sind mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten K mit $k_{obs} = k_f + k_r$ und $K = k_f/k_r$ berechnet worden, die Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger und Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger aus Gleichung 3.3. Im Fall der *ba*₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* findet Elektronentransfer ins binukleare Zentrum statt mit einer Rate von 770s⁻¹ (Farver et al., 2006a). Übereinstimmend mit den anderen Systemen wurde hier der Elektronentransfer zwischen Cu_A und Häm *a* betrachtet, dessen Werte für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion verwendet wurden. Die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten ist nicht bekannt und wurde hier für eine Abschätzung als unabhängig betrachtet.

digkeitskonstanten ist zu erkennen, dass die elektrometrischen Messungen schneller verlaufen als die Elektronenübertragung durch Puls-Radiolyse. Dies spiegelt sich auch in kleinen Variationen der Aktivierungsparameter wider. Hierbei befinden sich die hier erhaltenen Parameter zwischen denen für COX aus *Paracoccus denitrificans* und aus Rinderherz, wobei eine größere Aktivierungsentropie durch eine etwas geringere Aktivierungsenthalpie ausgeglichen wird. Der gleiche Trend sind für die Werte der *ba*₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* zu erkennen. Interessanterweise sind die Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten zwischen den Messungen an der *BLM* und aus der Puls-Radiolyse noch ausgeprägter als für das Enzym aus *Paracoccus denitrificans*. Die Werte für die Aktivierungsenthalpie und die Aktivierungsentropie liegen zwischen denen für die *aa*₃-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* und aus dem Rinderherz. Im Unterschied zu den beiden letztgenannten Enzymen findet in der *ba*₃-Oxidase eine Äquilibrierung des Elektrons zwischen Häm *a* und dem binuklearen Zentrum statt. Die beobachtete Relaxationszeit von $\tau = 1,3 \text{ ms}$ (Farver et al., 2006a) ist hierbei jedoch wesentlich langsamer bei Raumtemperatur als die zweite Relaxationszeit in den elektrometrischen Messungen ($\tau_2 = 202 \mu\text{s}$), die den Messungen für die *aa*₃-Oxidase folgend einer Protonenaufnahme entspräche.

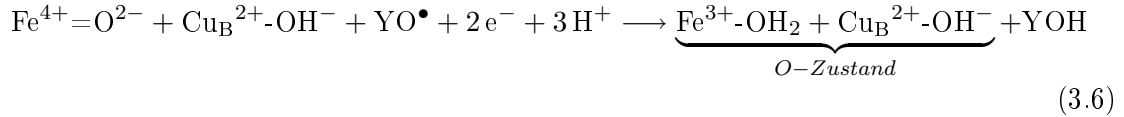
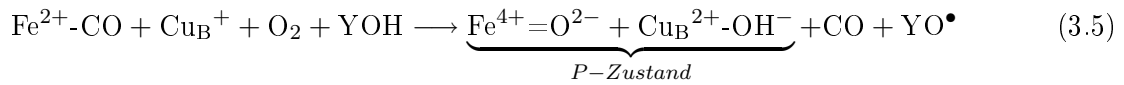
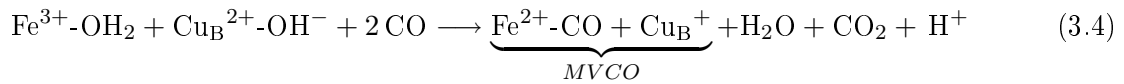
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Temperaturabhängigkeit für die Prozesse während des O→E-Überganges mit Hilfe der *BLM*-Technik untersucht wurde. Der Elektronentransfer besitzt eine niedrige Aktivierungsbarriere, die nicht durch die Protonierungsreaktion aus der Aufnahme des kompensierenden Protons beeinflusst wird. Während für den Zeitverlauf und das Ausmaß des Protonentransfers deutliche Einflüsse durch Wahl der Bedingungen beobachtet wurden, ist für die Barriere im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt kaum ein Effekt zu beobachten. Alle Messungen stimmen in ihrer Größenordnung mit den publizierten Daten für den Elektronentransfer überein.

3.1.3. Der P-Zustand

Der P-Zustand (oder P_M) ist schon mit verschiedenen Methoden an bakteriellen und mitochondrialen Oxidasen hergestellt worden. Im katalytischen Zyklus des Enzyms aus *Paracoccus denitrificans* ist der P→F-Übergang der letzte Teilschritt, der bisher nicht gründlich an der *BLM* charakterisiert wurde. Insbesondere die Anzahl der gepumpten Protonen (ein oder zwei), sowie die daran beteiligten Protonenkanäle sind für ein mechanistisches Verständnis entscheidend. Das setzt eine quantitative Herstellung dieses Zwischenproduktes voraus. Hier soll die pH-Abhängigkeit der Darstellung des P_M-Zustandes am Enzym aus *Paracoccus denitrificans* genauer untersucht werden, um die optimalen Bedingungen für eventuelle elektrometrische Messungen zu definieren.

Der P-Zustand kann mit verschiedenen Methoden hergestellt werden. Stöchiometrische Mengen an Wasserstoffperoxid bei hohem pH überführen das oxidierte binukleare Zentrum in den P-Zustand (Bickar et al., 1982; Vygodina and Konstantinov, 1989; Weng and Baker, 1991). Alternativ kann die Oxidase in das so genannte *mixed-valence* Enzym (MV-CO) durch Inkubation mit Kohlenmonoxid (CO) unter anaeroben Bedingungen überführt werden (Greenwood et al., 1974; Brzezinski and Malmström, 1985), das ein reduziertes binukleares Zentrum sowie oxidiertes Cu_A und Häm *a* besitzt. Eine anschließende Reaktion mit Sauerstoff erzeugt den P-Zustand (Chance et al., 1975; Clore et al., 1980; Clore, 1980). Ebenso entsteht diese Form der Oxidase bei Begasung mit Kohlenmonoxid in Anwesenheit von Sauerstoff (Nicholls and Chanady, 1981).

3. Ergebnisse



Aus der Gleichungen 3.4-3.6 ist zu erkennen, dass die Bildung des Zweielektronen reduzierten Zustandes pH-abhängig ist, wobei die Bildung des MVCO bei hohem pH-Wert begünstigt ist. Bei der Bildung des P-Zustandes wird molekularer Sauerstoff in einer konzertierten Reaktion reduziert. Als Resultat geht Häm_a₃ in einen Ferryl-Zustand über (Han et al., 1990; Proshlyakov et al., 1998). Hierbei werden drei der vier benötigten Elektronen für die Sauerstoffreduktion vom binuklearen Zentrum bereit gestellt (s. Gl. 3.5), das vierte stammt von einem Tyrosinrest (Y[•], MacMillan et al. (1999); Rich et al. (2002); Budiman et al. (2004)). Die Zusammenhänge der verschiedenen Ferryl-Spezies (P-, F'- und F-Zustand), ihre Interkonvertierbarkeit, sowie die pH-Abhängigkeit der einzelnen Reaktionen sind für das Rinderherzenzym in mehreren Artikeln diskutiert worden (Jünemann et al., 2000; Fabian and Palmer, 1995, 2001).

Die beste Ausbeute und Handhabbarkeit bei der Einstellung P-Zustandes wurde durch direktes Begasen des oxidierten Enzyms mit Kohlenmonoxid erreicht. Die Reaktion verläuft einphasig und ist bei allen hier untersuchten pH-Werten innerhalb von 7 min zu Ende. Die Bildung des P-Zustandes lässt sich leicht anhand des Absorptionsspektrums im sichtbaren Bereich verfolgen. Verglichen mit dem Rinderherzenzym, weist das Differenzspektrum (P *minus* O) eine Rotverschiebung auf (s. Abbildung 3.6(a)). Dies ist auch zuvor beobachtet worden (Iwaki et al., 2004). Die charakteristischen Signaturen des P-Zustandes sind deutlich ausgeprägt: die negative Bande um 630 nm, die auf das Auflösen der *charge transfer* Bande zwischen Häm *a*₃ und Cu_B hinweist, die positiven Peaks im α-Bereich (609 nm und 567 nm), sowie die Verschiebung der Soretbande, die zu dem Peak bei 440,5 nm und dem Tal bei 417 nm führt. Die Ausbeute an P-Zustand ist pH-abhängig, was in Abbildung 3.6(b) dargestellt ist. Mit zunehmendem pH-Wert steigt die Ausbeute an P-Zustand, während unterhalb von pH 6 die Darstellung des P-Zustandes nicht mehr erfolgt. Wichtig zu erwähnen ist, dass bei pH 7,4, dem Wert, bei dem unter Standardbedingungen die elektrometrischen Messungen durchgeführt werden, sich nur 25% aller Oxidasemoleküle im P-Zustand befinden.

Tatsächlich ist nicht nur die Bildung des P-Zustandes, sondern auch der Zerfall vom pH-Wert abhängig (Jünemann et al., 2000; Oda et al., 2004), wie auch an der formalen Gleichung 3.6 zu erkennen ist. Analysiert man die Kurve in Abb. 3.6(b) mit einem einfachen Bindungsmodell, erhält man eine Protonenbindungsstelle mit einem pK_s-Wert von 8,0 und einem apparenten Hill-Koeffizienten von 0,5. Die Elektronen, die zur Bildung des O-Zustandes benötigt werden, stammen wahrscheinlich aus der Disproportionierung zweier Oxidasemoleküle im P-Zustand, wie es auch schon für andere Zustände beobachtet wurde (Ruitenbergh et al., 2002): Die Halbwertszeit des P-Zustandes ist bei COX, die in Liposomen rekonstituiert wurde, höher als im solubilisierten Zustand. Eine zweite Elektronenquelle stellt residuelles Kohlenmonoxid dar. An den notwendigen Protonenbewegungen

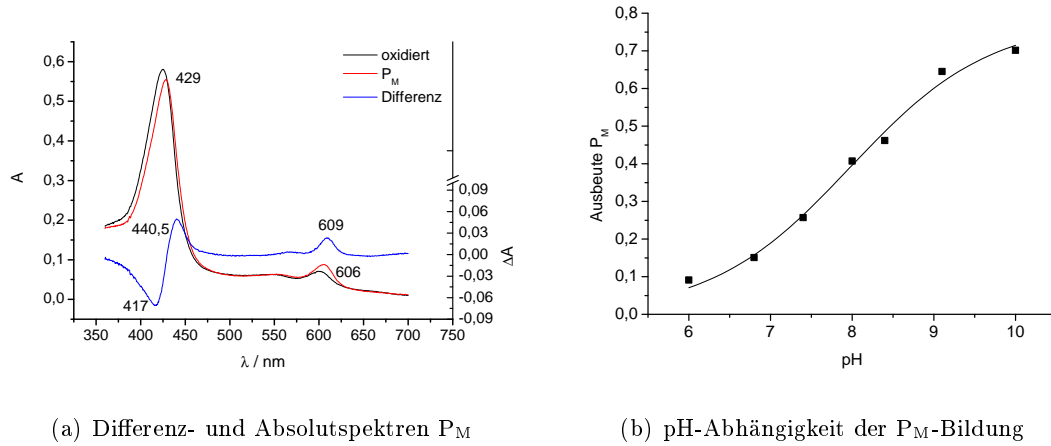


Abbildung 3.6.: Absorptionsspektrum des P_M-Zustandes und die pH-Abhängigkeit seiner Bildung:

In (a) sind die spektralen Änderungen bei Ausbildung des P_M-Zustandes bei pH 9,1 gezeigt (linke Achse Absolutspektren, rechte Differenzspektrum P_M minus oxidiert). Die Wellenlängen der Maxima und Minima für den P_M-Zustand sind in den jeweiligen Spektren angezeigt. Die Bildung und/oder Zerfall des P_M-Zustandes weist eine pH-Abhängigkeit wie in Abb. (b) auf. Die Messungen wurden in 50 mM Puffer (Bistris pH 6,0; K-P_i pH 6,8, 7,4 und 8,0; Tris pH 8,4; Borat pH 9,1 und CHAPS pH 10) und 0,05% LM durchgeführt. Konzentrierte Oxidase (700 μM) wurde in den entsprechenden luftgesättigten Puffer verdünnt. Nach Aufnahme des Spektrums des oxidierten Enzyms wurde die Probe für 10s mit CO begast und Spektren über der Zeit aufgenommen. Anschließend wurde die Probe vollständig mit Dithionit reduziert. Die Konzentration des P-Zustandes wird aus dem Differenzspektrum mit $\epsilon_{609-632\text{ nm}} = 10,4\text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und die Enzymkonzentration aus dem Differenzspektrum Red(CO) minus O mit $\epsilon_{606-621\text{ nm}} = 29,4\text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ berechnet.

sind auch bei diesen Reaktionen die beiden Protonentransferwege, der D- und/oder der K-Kanal beteiligt. Die Ausbeute an P_M bei pH 8,4 ist abhängig von der Inkubationszeit der Liposomen bei diesem pH-Wert. Mit der Äquilibration der Innenphase der Vesikel, also nach längerer Inkubationszeit, erhöht sich die Ausbeute, während sie in den ersten Minuten nach Zugabe der COV in die jeweiligen Puffer unabhängig vom äußeren pH-Wert ist.

Für die elektrometrischen Messungen ist die Ausbeute ein wichtiger Faktor für die Interpretierbarkeit der Signale bei den verschiedenen Übergängen. Dies gilt insbesondere für den P-Zustand und die Frage, ob ein oder zwei Protonen bei dem P→F-Übergang gepumpt werden. An der COX können mit der BLM-Technik jedoch keine Messungen über pH 8,4 durchgeführt werden. Hier erhält man maximal 50% Ausbeute an P_M. Wie in Abbildung 3.7 gezeigt, nimmt die Amplitude des Photopotentials nach einem pH-Sprung stark und schnell ab. Daher kann die Ausbeute nicht durch Variation des pH-Wertes erhöht werden. Der Grund für die schnelle und starke Abnahme des Signales bleibt unklar. Entweder handelt es sich um eine Ablösung der adsorbierten Vesikel von der BLM, oder die Bindung von Rubpy ist bei pH 9,2 sehr gering oder sehr stark, wodurch ein Elektron wieder auf das oxidierte Rubpy³⁺ übergeht. Somit bleibt festzuhalten, dass keine weiteren Ergebnisse mit der COX aus *Paracoccus denitrificans* in Hinblick auf den P→F-Übergang erzielt werden konnten.

3.1.4. Der F-Zustand

Der F-Zustand entsteht in einer Reaktion mit Wasserstoffperoxid, die abhängig von molarem Verhältnis und pH-Wert ist (Wrigglesworth, 1984; Weng and Baker, 1991; Fabian and Palmer, 1995). Er befindet sich auf einer Reduktionsebene, die drei Äquivalente über der des O-Zustandes steht (Verkhovsky et al., 1996), und zeichnet sich durch eine Ferryl-Form im binuklearen Zentrum aus (Varotsis and Babcock, 1990; Proshlyakov et al., 1996). In Hinblick auf diese Arbeit war die Herstellung des F-Zustandes wichtig als Referenz für die Messungen mit der N131D-Mutante (s. Abschnitt 3.1.6 auf S. 53) und als Ausgangszustand für Mehrfachblitzexperimente: Durch Einelektronenreduktion beim $F \rightarrow O$ -Übergang wird hier der postulierte aktivierte H-Zustand erreichbar (Verkhovsky et al., 1999b; Bloch et al., 2004). Weitere Einelektronenübergänge von diesem instabilen Zustand sollten helfen aufzuklären, ob in einem anschließenden $O \rightarrow E$ -Übergang ein Proton gepumpt wird. Weiterhin ist der F-Zustand ein leicht zugänglicher Zustand, um die Temperaturabhängigkeit des Protonentransfers durch den D-Kanal sowie eines Pumpschrittes zu untersuchen, da sowohl das chemische als auch das gepumpte Proton im $F \rightarrow O$ -Übergang über diesen Weg aufgenommen wird (Konstantinov et al., 1997).

Wie die Bildung des P-Zustandes ist auch die des F-Zustandes vom pH-Wert abhängig und darüber hinaus von der Stöchiometrie der eingesetzten H_2O_2 -Konzentration (Jünemann et al., 2000). Für eine quantitative Herstellung des F-Zustandes wurde ein 50-100facher molarer Überschuss an H_2O_2 verwendet. In Abbildung 3.8 ist die Einstellung des F-Zustandes bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Nur bei pH-Werten über 8,4 ist nach 10 min noch eine Fraktion an Oxidasemolekülen im P-Zustand ($\approx 10\%$) zu erkennen. Die Ausbeuten, c_P und c_F , lassen sich aus folgenden Wertepaaren des Differenzspektrums mit den entsprechenden millimolaren Extinktionskoeffizienten ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) berechnen (Rich et al., 2002):

$$\begin{pmatrix} A_{580-632\text{nm}} \\ A_{609-632\text{nm}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1,9 & 4 \\ 10,4 & 1,9 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_P \\ c_F \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

Bezüglich der Ausbeuten herrscht eine gewisse Unsicherheit, da die Extinktionskoeffizienten nicht bestimmt, sondern diejenigen der Rinderherzoxidase übernommen worden sind (Rich et al., 2002). Trotz dieses systematischen Fehlers lassen sich die Ausbeuten bei unterschiedlichen pH-Werten vergleichen (Abb. 3.8(b)). Nach längerer Inkubationsdauer mit einem Überschuss an H_2O_2 kann die COX aus *Paracoccus denitrificans* unabhängig vom pH in den F-Zustand gebracht werden. Die Reaktion in Proteoliposomen verlief mit einer

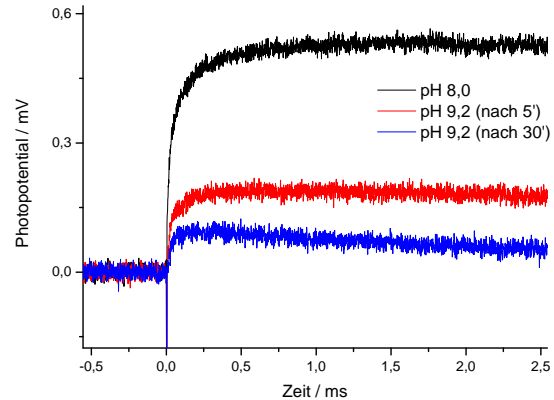


Abbildung 3.7.: Anlagerung von COV bei pH 8,0: Nach Aufnahme des ersten Signales wird der pH-Wert durch Zugabe einer konzentrierten Boratlösung auf pH 9,2 gebracht und die Signale nach dem pH-Sprung gemessen.

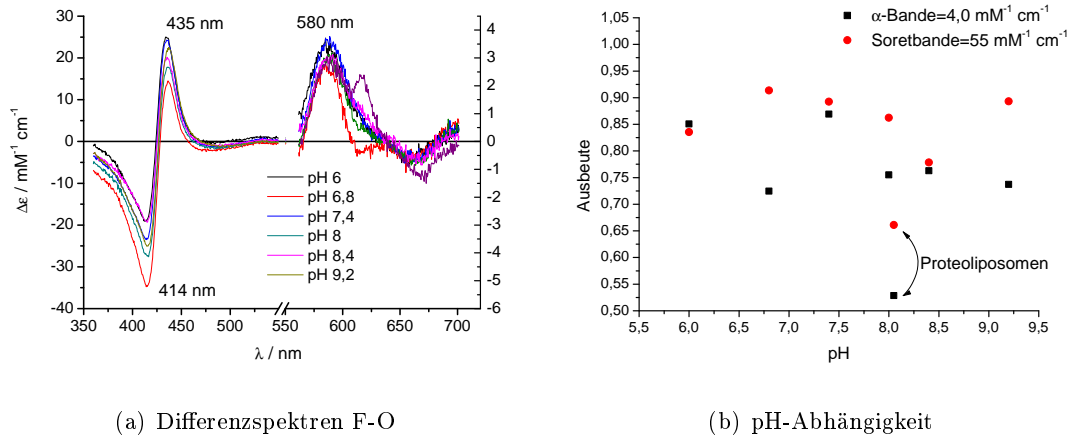


Abbildung 3.8.: F-Zustand bei verschiedenen pH-Werten: (a) Differenzspektren aus F *minus* O. Ungefähr 3 μM COX reagieren mit 50 μM H_2O_2 in 50 mM Puffer bei verschiedenen pH-Werten (pH 6,0 Bistris; pH 6,8, 7,4 und 8,0 Kaliumphosphat; pH 8,4 Tris; pH 9,2 Borat). Die Konzentration der einzelnen Ansätze wurde aus den Red-Ox Differenzspektren nach anschließender Reduktion durch Zugabe von Dithionit berechnet. Die Reaktion mit H_2O_2 war nach 15 min beendet. (b) Ausbeute an F-Zustand bei verschiedenen pH-Werten am Ende der Reaktion. Die Ausbeuten wurden mit den angegebenen Extinktionskoeffizienten berechnet. Die Ausbeute der COX in Proteoliposomen bei pH 8,0 ist ebenfalls angegeben.

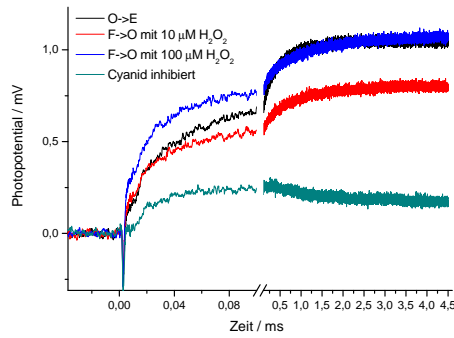
etwas geringeren Ausbeute, war aber dennoch deutlich feststellbar. Das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* kann demnach durch die Reaktion mit H_2O_2 zu über 80% unter den Bedingungen an der BLM in den F-Zustand überführt werden.

Neben dem Effekt unterschiedlicher pH-Werte wurde auch der Einfluss von Chlorid auf die Ausbildung des F-Zustandes an drei verschiedenen Enzympräparationen untersucht. Zwei davon folgten einer chloridfreien Aufreinigung, während die dritte einen chloridhaltigen Hintergrund besaß. Interessanterweise sank die Ausbeute an F-Zustand dramatisch nach einer zweistündigen Inkubation in Anwesenheit von 100 mM Chlorid sowohl bei pH 7,4 als auch pH 6,5 von 80% auf $\leq 10\%$. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Enzympräparation. Da einer der Präparationen immer Chlorid enthält, stellt sich die Frage, in wie weit es sich um einen spezifischen Effekt handelt oder um eine zeitabhängige Entwicklung. Für das Absenken der Ausbeute war jedoch Chlorid erforderlich. Der Effekt ist soweit nicht verstanden, fügt sich jedoch in die Diskussion um die Heterogenitäten der Oxidase (s. Abschnitt 3.1.5).

Obwohl die spektroskopischen Messungen eindeutig die Anwesenheit des F-Zustandes auch in den Proteoliposomen nachwiesen, wurde in den elektrometrischen Messungen keine entsprechende Änderung im Photopotential beobachtet. Für die COX aus verschiedenen Organismen wurde übereinstimmend eine Millisekundenphase im F \rightarrow O-Übergang gefunden, die in ihrer Amplitude in etwa der Summe aus der Elektronen- und Protonenaufnahme entsprach und daher einem Protonenpumpschritt über die gesamte Membran zugeordnet wurde, für das Rinderherzenzym (Zaslavsky et al., 1993; Jasaitis et al., 1999; Siletsky et al., 1999a), die Oxidase aus *Rhodobacter sphaeroides* (Konstantinov et al., 1997) und aus *Paracoccus denitrificans* (Kannt et al., 2001).

Wasserstoffperoxid hat zwar einen Effekt auf die elektrometrischen Messungen an der

3. Ergebnisse



(a) $F \rightarrow O$ -Übergang

	schnell	mittel	langsam
$O \rightarrow E$	29 μs (± 7) $\alpha_1 = 59\%$	0,35 ms ($\pm 0,063$) $\alpha_2 = 41\%$	
$F \rightarrow O$ 10 μM H_2O_2	17 μs (± 6) $\alpha_1 = 54\%$	0,13 ms ($\pm 0,034$) $\alpha_2 = 20\%$	0,88 ms ($\pm 0,14$) $\alpha_3 = 25\%$
$F \rightarrow O$ 100 μM H_2O_2	18 μs (± 6) $\alpha_1 = 59\%$	0,13 ms ($\pm 0,040$) $\alpha_2 = 17\%$	1,10 ms ($\pm 0,17$) $\alpha_3 = 24\%$

(b) Parameter für $F \rightarrow O$ -Übergang

Abbildung 3.9.: Der $F \rightarrow O$ -Übergang : Typisches Experiment für den Einfluss auf den Zeitverlauf des Spannungsaufbaus nach Elektroneninjektion. Die Messungen wurden in 10 mM K-P_i, pH 7, 4, durchgeführt. In spektroskopischen Kontrollexperimenten konnte für die verwendeten Proteoliposomen eine Ausbeute von 60 % an F-Zustand berechnet werden. Die Tabelle enthält die Daten aus den Messungen für drei verschiedene Enzympräparationen.

COX (s. Abb 3.9), aber die Entwicklung der relativen Amplituden im Vergleich zum $O \rightarrow E$ -Übergang ist nicht in Übereinstimmung mit einer Pumpphase im Millisekundenbereich. Die kleine Phase, die hier in den Messungen zu beobachten ist, spricht nicht für die Erfassung des gepumpten Protons in den elektrometrischen Messungen. Das gleiche Verhalten wurde auch für Proteoliposomen mit COX aus *Rhodobacter sphaeroides* gesehen. Da die spektroskopischen Messungen, die Aktivität des Enzyms verschiedener Präparationen und Spezies alle die Anwesenheit des F-Zustandes eines funktionellen Enzyms bestätigten, können die hier erhaltenen Resultate nicht erklärt werden. Für die elektrometrischen Messungen ist daher noch ein weiterer Faktor anzunehmen, der mit den Messungen an der COX interferiert.

3.1.5. Variabilität in elektrometrischen Messungen und Heterogenitäten

In den Messungen des $O \rightarrow E$ -Übergang manifestierte sich neben der beobachteten pH-Abhängigkeit (s. Abschnitt 3.1.1 auf S.35) auch eine intrinsische Variabilität in den beiden Phasen der erhaltenen Photopotentiale. Diese äußerte sich zum einen in Zeitkonstanten für die Protonen- und Elektronenphase, die bis zu einem Faktor 2 schwankten, zum anderen in unterschiedlichen Amplitudenverhältnissen der beiden Phasen zueinander.

In Abbildung Abb. 3.10 sind zwei Experimente unter so weit wie möglich identischen Bedingungen zu sehen. Während das Signal der Dialysevesikel (—) zwei Phasen für die Elektronen- und Protonenaufnahme aufweist, findet sich in dem Experiment mit den anderen Proteoliposomen (—) nur noch eine Phase. Erwähnenswert ist dieses Verhalten insbesondere aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Vesikeln um zwei Rekonstitutionen handelt, die an demselben Tag mit derselben Proteinaufreinigung und mit denselben Chemikalien durchgeführt wurden. Der Unterschied besteht nur in der Art und Weise der Detergensreduktion; für eine Hälfte wurde eine Dialyse und für die andere Adsorption an Biobeads durchgeführt.

Auch wenn es sich bei den dargestellten Beispielen um extreme Fälle handelt, unter-

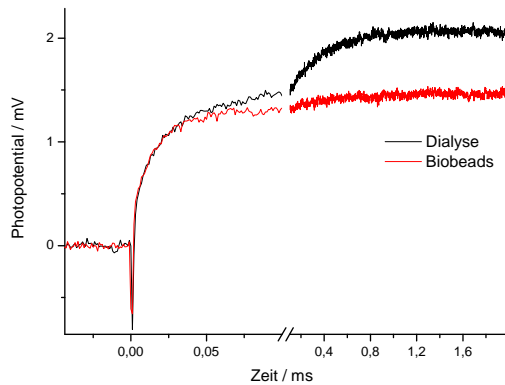


Abbildung 3.10.: Beispiel für die Variabilität in der relativen Amplitude der Protonenphase beim O→E-Übergang: Die Experimente wurden unter gleichen Bedingungen am selben Tag aufgenommen. Die Amplituden sind auf die schnelle Phase normiert. Details siehe Text.

liegt insbesondere die relative Amplitude der Protonenphase Schwankungen. Es wurde versucht, Korrelationen zu der Wahl der Bedingungen bei der Rekonstitution und der Versuchsdurchführung zu finden. Dabei wurden verschiedene pH-Werte, Detergenzien, Lipidkompositionen, Puffer und jeweils verschiedene Chargen der betreffenden Chemikalien verwendet. Auch unterschiedliche Proteinpräparationen, chloridfreies Enzym und gepulste Oxidase (s.u.) zeigten Unterschiede in den einzelnen Messungen. Ein einziger Grund für die Variabilität stellte sich bei über 300 Einzelmessungen jedoch nicht heraus, sondern war Charakteristikum der einzelnen Liposomenpräparation. Dennoch lassen sich folgende wichtige Punkte festhalten:

- Die Messungen mit einer Liposomenpräparation sind reproduzierbar. Allerdings zeigte sich oftmals ein Einfluss der Lagerung auf die Amplitude, so dass meist nur mit frischen Proteoliposomen gemessen wurde.
- In den meisten Messungen des O→E-Übergangs ($\geq 90\%$) war die Protonenphase vorhanden. Ihre relative Amplitude am Gesamtsignal beträgt im Mittel $38 \pm 5\%$. Der O→E-Übergang ist mit der Aufnahme eines kompensierenden Protons behaftet.
- Die Abwesenheit einer zweiten Zeitkonstante in der Kinetik des O→E-Übergang ist die Ausnahme. Hierfür müssen kleine Veränderungen in den Bedingungen während der Rekonstitution oder den elektrometrischen Messungen verantwortlich sein. Eine einfache Erklärung fehlt, vielmehr mag die Variabilität der Protonenphase ein multikausales Ergebnis darstellen.

Wie in Abschnitt 1.2.3 auf S. 12 beschrieben, sind insbesondere für das Rinderherzenzym Heterogenitäten für die gereinigte Form der COX bekannt. Es wurden verschiedene Methoden beschrieben, die es erlauben, unterschiedliche Formen zu diskriminieren. Einige dieser Indikatoren sollen hier am Enzym aus *Paracoccus denitrificans* angewendet werden, um verschiedene Enzympräparationen klassifizieren zu können. Eine Korrelation zwischen der Variabilität der Protonenphase in den elektrometrischen Messungen mit verschiedenen Zuständen der COX wie die schnelle, langsame oder Chlorid bindende Form könnte hierfür eine Erklärung bieten:

- Finden sich unterschiedliche Geschwindigkeiten der Cyanidbindung in den verschiedenen Enzympräparationen und lassen sich die Geschwindigkeiten durch Inkubation

3. Ergebnisse

des Enzyms bei niedrigem pH (Übergang zur langsamen Form) oder mit Chlorid (Übergang zur Chlorid bindenden Form) verändern?

- Kann ein homogener Ausgangszustand durch *Pulsen* herbeigeführt werden?
- Unterscheidet sich das reduzierte binukleare Zentrum verschiedener Präparationen in Photolysestudien mit CO als Sonde?

Cyanidbindungskinetik Der Zeitverlauf der Cyanidbindung ist mit verschiedenen Enzympräparationen durchgeführt und mit der Rinderherzoxidase als Standard verglichen worden. Ausgehend von der Klassifizierung in langsame oder schnelle Form, die mit bimolekularen Ratenkonstanten von $2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $0,02 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ beschrieben worden sind und hier für das Rinderherzenzym wiederholt werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurde die Cyanidbindungsrate für verschiedene Enzympräparationen bestimmt. Um das Enzym in seine langsame Form zu überführen, wurde es vor der Bindungskinetik bei niedrigem pH inkubiert. Um Chloridbindung zu induzieren, wurde Chlorid dem Inkubationspuffer zugesetzt.

In den meisten Versuchen war ausschließlich eine schnelle Phase mit einer Ratenkonstante von $\approx 5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ zu beobachten (s. Abb. 3.11(a)), in Proben mit einer zweiten Phase überstieg diese jedoch nicht 10% der Gesamtamplitude. Dennoch ließen sich verschiedene Formen anhand ihrer Differenzspektren erkennen. Während sich im Differenzspektrum der Cyanid inhibierten Form, bezogen auf den oxidierten Zustand, die Maxima bei 436 nm und 590 nm befinden, gibt es auch noch eine weitere Form mit den entsprechenden Werten bei

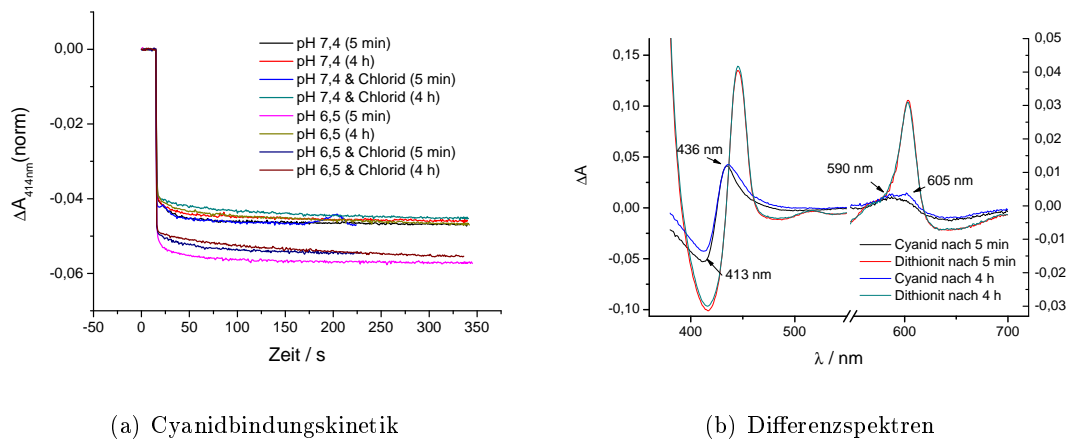


Abbildung 3.11.: Cyanidbindung unter verschiedenen Bedingungen. (a) $2 \mu\text{M}$ solubilisierte COX wurde in $0,1 \text{ M}$ Puffer (HEPES pH 7,4 und MES pH 6,5, $\pm 150 \text{ mM}$ Chlorid) inkubiert und die Bindungskinetik nach 5 min und 4 h Inkubation durch Zugabe von 34 mM Cyanid aus einer 1 M neutralisierten Stammlösung gestartet. Die Amplitude bei 414 nm wurde auf die Amplitude $A_{606-621\text{nm}}$ aus den Redox-Differenzspektren mit Dithionit normiert. (b) Differenzspektren der Probe bei pH 6,5 nach *minus* vor der Bindungskinetik. Die Referenzspektren der oxidierten Probe wurden jeweils direkt vor der Kinetik aufgenommen. Nach vier Stunden Inkubation sieht man die Ausbildung einer zweiten Spezies in den Cyaniddifferenzspektren (siehe Angaben in der α -Bande), die jedoch mit derselben Kinetik Cyanid bindet. Die Differenzspektren nach Dithionitreduktion sind hingegen für die Proben nach Inkubation von 5 min und 4 h identisch.

442 nm und 605 nm (s. Abb. 3.11(b)). Diese Form wurde hauptsächlich nach Verdünnen der Stammlösung und Inkubation der Oxidase im Reaktionspuffer entdeckt. Die Werte könnten auf eine Reduktion von Häm *a* hindeuten, d.h. durch bloßes Warten entsteht eine Spezies, die durch Cyanidzugabe zum Teil reduziert wird. Es handelt sich nicht um eine Fraktion an teilreduziertem Enzym, die während der Inkubation entstanden sein könnte, da als Referenz für die Differenzspektren jeweils ein Spektrum direkt vor der Cyanidzugabe, also nach der Inkubationszeit, dient.

Chlorid und niedriger pH haben gegenüber diesem ersten Effekt nur eine geringe Wirkung auf die Cyanidbindungskinetik der COX aus *Paracoccus denitrificans* im Gegensatz zum Rinderherzenzym. Die Existenz der verschiedenen Formen lässt sich daher mit der Cyanidbindung für dieses bakterielle Enzym nur schwer klären, bzw. die Cyanidbindung ist als Test auf die Anwesenheit verschiedener Formen nicht geeignet.

Pulsen Um die verschiedenen heterogenen Formen der COX in einen einheitlichen Zustand zu bringen, sind in der Literatur mehrere Pulsprozeduren beschrieben worden (Antonini et al., 1977, 1985). Allen gemein ist die Abfolge von Reduktion und Reoxidation der COX (Baker et al., 1987; Moody et al., 1991b, 1995; Giuffré et al., 1998).

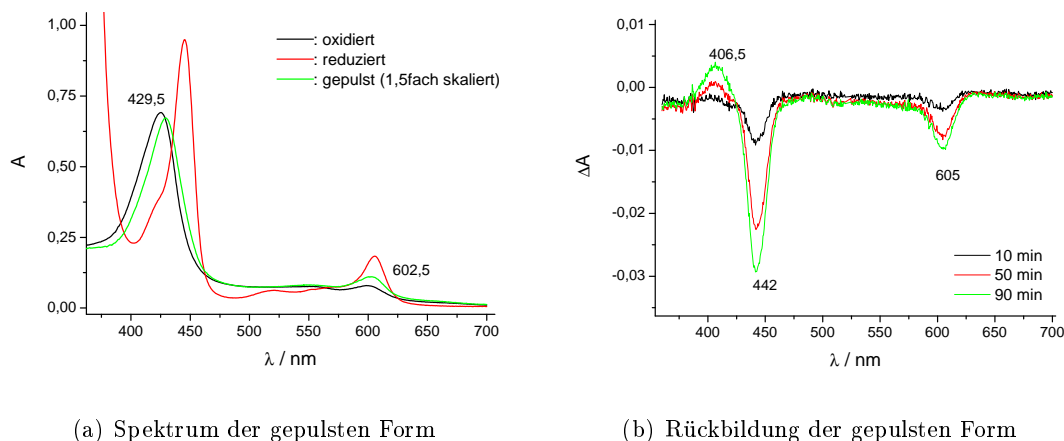


Abbildung 3.12.: Gepulste Form der COX: 1 μ l konzentrierte COX (500 μ M) wird eine Stunde anaerob mit 1 μ l 20 mM Dithionit inkubiert. Danach werden 1 ml Puffer (50 mM Kaliumborat, pH 9,1) zugegeben und anschließend die Spektren aufgenommen. (a) Vergleich der Absolutspektren der oxidierten (*resting*), mit Dithionit reduzierten und der gepulsten Form. Die ersten beiden Spektren wurden mit einer verdünnten Vergleichsprobe aufgenommen. Die Wellenlängenangaben beziehen sich auf die Maxima der gepulsten Form in der Soret- und in der α -Bande. (b) Differenzspektren der gepulsten Probe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Reoxidation. Als Referenz wurde das Spektrum direkt nach der Reoxidation verwendet.

Wie für das Rinderherzenzym beschrieben (s. Moody, 1996), verschiebt sich nach Pulsen das Soretmaximum bathochrom gegenüber der ungepulsten Form (Abb. 3.12(a)). Die so erhaltene Form erweist sich jedoch nicht als stabil und geht über Stunden zurück in ihre ursprüngliche Form (Abb. 3.12(b)). Ein Grund könnte die Anwesenheit weiterer teilreduzierter Spezies sein, die langsam in die oxidierte Form relaxieren. Allerdings war das Ergebnis reproduzierbar, so dass nach dem Pulsen jeweils die gleiche Zusammensetzung vorhanden sein müsste. Die Differenzspektren in Abbildung 3.12(b) haben keine Ähnlich-

3. Ergebnisse

keit mit demjenigen von anderen Zuständen. Das ließe auch die Möglichkeit einer zweiten oxidierten Form mit einem anderen sichtbaren Spektrum zu. Die Ergebnisse sind hier nicht eindeutig.

Die Differenzspektren zwischen der gepulsten und der relaxierten Form weisen ähnlich spektrale Signaturen wie die oben beschriebenen inkubierten Spezies für die Cyanidbindung auf (s. 3.11(b) auf S. 50): Die Lage der Peaks deutet auf eine Häm α -Reduktion hin. Allerdings bewirkt die Zugabe von Ferricyanid keine beschleunigte Umwandlung. Daher ist nicht auszuschließen, dass es eine weitere Form mit einem unterschiedlichen Spektrum gibt.

Die Kinetik dieser Form in der Cyanidbindung oder der Reaktion mit CO unterscheidet sich jedoch nicht von dem Enzym vor dem Pulsen. Lediglich die Amplitude der Cyanidbindung ist bei 414nm geringer. In den elektrometrischen Messungen beim O→E-Übergang war kein Unterschied in den Signalen zu erkennen. Auch die gepulste Form wies eindeutig zwei Phasen auf. Allerdings ist zum Zeitpunkt der Messung, also nach ungefähr einer Stunde Anlagerung, ein Großteil der gepulsten Form wieder in die ursprüngliche Form übergegangen, so dass hier keine gesicherten Aussagen bezüglich des elektrischen Verhaltens getroffen werden können.

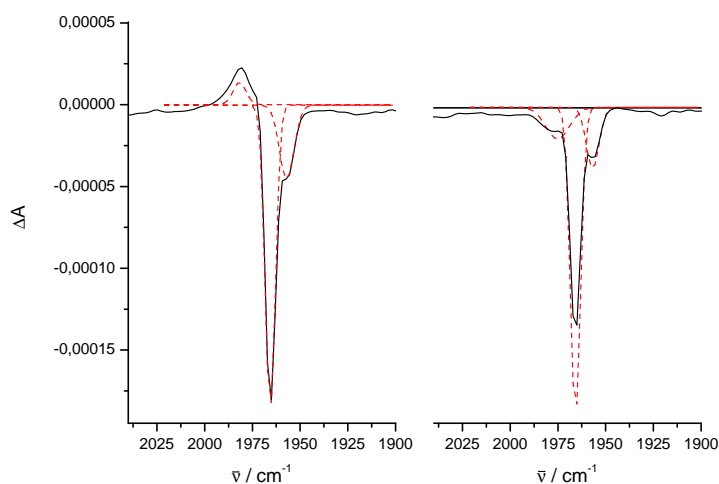


Abbildung 3.13.: Vergleich zweier Enzympräparationen von COX aus *Paracoccus denitrificans*: Gezeigt sind die FT-IR Differenzspektren von Red *minus* RedCO im Bereich der CO-Photolyse des an Häm a_3 gebundenen CO-Moleküls, sowie die Simulationen der Einzelpeaks (—). Der Anteil der kleineren Peaks beträgt im ersten Fall 20% und im zweiten 30%.

Photolyse von CO aus dem reduzierten Enzym Eine weitere Möglichkeit, die Integrität der Oxidase zu prüfen, besteht in der Photolyse von CO aus der reduzierten Form (Red-CO). Lichtanregung führt zur Freisetzung von CO aus seiner gebundenen Form an Häm a_3 . Das FT-IR Differenzspektrum Red *minus* RedCO bei 1965 cm^{-1} ist ein Indikator für die Bindungsumgebung des CO im binuklearen Zentrum. Während im Rinderherzenzym nur eine Bande sichtbar wurde (Rich and Breton, 2001), fanden sich in den bakteriellen Oxidasen pH-abhängige Verschiebungen und Aufteilungen dieser Bande (Mitchell et al.,

1996a,b; Rost et al., 1999). Die Resultate wurden als Anwesenheit verschiedener Konformere diskutiert, die als α , β und γ -Konformer bezeichnet werden.

Die relativen Populationen verschiedener Konformere ist unterschiedlich in einzelnen Enzympräparationen. Tatsächlich gibt es auch bei den bakteriellen Oxidasen Proben, die nur eine Bande aufzeigen (pers. Mitteilung von Prof. P. Rich). Weil für diese Unterschiede keine Liganden wie Chlorid, die nicht an die reduzierte Form binden können, in Frage kommen, spiegelt die Photolyse von CO die inhärente Heterogenität des binuklearen Zentrums wider. In Abbildung 3.13 sind zwei verschiedene Enzympräparationen gezeigt. Deutlich sind neben dem Hauptpeak die zwei kleineren zu erkennen, die sich in ihrem Anteil am Gesamtsignal deutlich unterscheiden, insbesondere der Peak bei 1978 cm^{-1} .

Neben der Unterschieden in den FT-IR Differenzspektren waren die Cyanidbindungskinetiken oder die Ausbeute an P_M bei diesen beiden Enzympräparationen vergleichbar. Inwieweit die Konformere Einfluss auf die elektrometrischen Messungen besitzen, bleibt unklar.

3.1.6. Die N131D-Mutante

Mutanten der COX sind eine große Hilfe bei der Identifizierung von Aminosäureresten, die an intramolekularen Protonenbewegungen beteiligt sein könnten (siehe für eine Übersicht von Mutanten bei *Paracoccus denitrificans* Pfitzner et al., 1998). Während viele Mutationen in den Protonentransferwegen zu einem funktionalen Defekt der COX führen, zeigt die Mutante N131D (in Untereinheit I) einen interessanten Phänotyp: Bei gleichbleibender Aktivität an Sauerstoffreduktion, also Elektronentransfer, findet kein Protonen-pumpen mehr statt (Pfitzner et al., 2000).

Der Aminosäure N131 liegt in der Mitte des D-Kanals (Abb. 3.14), ungefähr 5 Å vom dem Eingang bei D124 und knapp 20 Å von der letzten Aminosäure bei E278 entfernt. In der entsprechenden Mutante aus *Rhodobacter sphaeroides* (N139D) konnte ein Einfluss der Mutation auf den $P \rightarrow F$ -, und den $F \rightarrow O$ -Übergang nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp ist der letztere in der Mutante um einen Faktor 2 beschleunigt (Pawate et al., 2002). In der Reaktion des reduzierten Enzyms mit Sauerstoff zeigt sich eine veränderte pH-Abhängigkeit in der Bildungsrate des F-Zustandes: Der apparente pK_s -Wert ist gegenüber dem Wildtyp um 1,6 Einheiten erhöht (Namslauer et al., 2003). Hierdurch findet kein Protonentransfer von E278 zur Bindungsstelle für die gepumpten Protonen mehr statt, sondern ausschließlich zum binuklea-

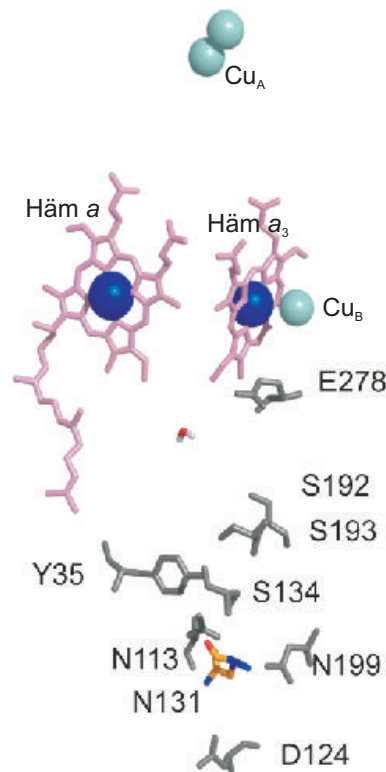


Abbildung 3.14.: Die Aminosäure N131: Die am D-Kanal beteiligten Reste sowie die Metallzentren der COX sind dargestellt. Die Aminosäure N131 ist farbig gezeigt.

3. Ergebnisse

ren Zentrum für die Wasserbildung (Namslauer and Brzezinski, 2004). Im folgenden soll die N131D-Mutante aus *Paracoccus denitrificans* mit der *BLM*-Technik untersucht und mit der klassischen D-Kanalmutante D124N (Konstantinov et al., 1997; Ruitenberg et al., 2000) verglichen werden, die im Vergleich zur N131D-Mutante nur eine residuelle Aktivität aufweist.

Der O→E-Übergang Der O→E-Übergang zeigt sowohl bei der N131D- als auch bei der D124N-Mutante zwei zeitlich getrennte Prozesse im photoelektrischen Signal. Neben dem schnellen Elektronentransfer zwischen Cu_A und Häm a ($27\ \mu\text{s}$) findet sich auch der zweite langsamere Prozess, der der Protonenaufnahme zugeordnet ist ($237\ \mu\text{s}$, Abb. 3.15). Im Vergleich zur D124N-Variante sind keine Unterschiede zu erkennen. Die langsamere Phase lässt sich wie im Wildtyp durch Zugabe von Cyanid inhibieren.

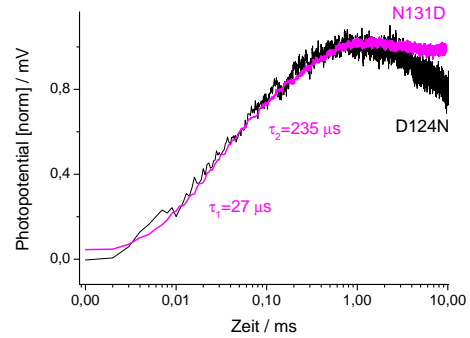
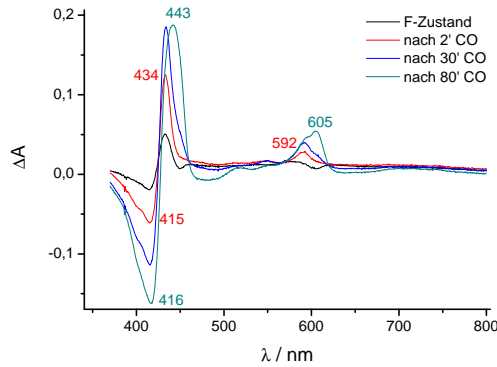


Abbildung 3.15.: O→E-Übergang der N131D-Mutante: Die Signale wurden unter Standardbedingungen gemessen.

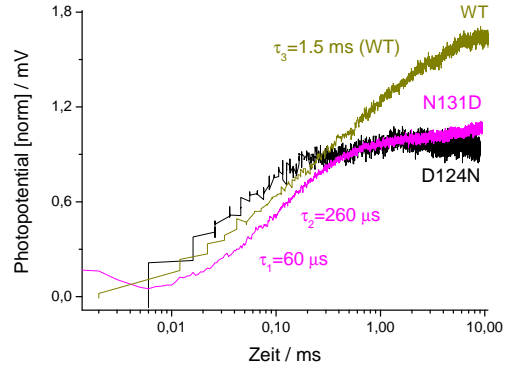
Der E→R-Übergang Die Darstellung des E-Zustandes erfolgt über die Zweielektronenreduktion des F-Zustandes durch Kohlenmonoxid unter anaeroben Bedingungen (Ruitenberg et al., 2002). Nach Bildung des F-Zustandes und anschließender Begasung mit CO bilden sich die spektralen Charakteristika im Differenzspektrum des E-Zustandes über der Zeit aus (Abb. 3.16(a)), Soretmaximum und -minimum bei 443 nm und 416 nm sowie im α -Bereich bei 605 nm (Moody et al., 1991a; Witt et al., 1986; Witt and Chan, 1987). Gleichzeitig bilden sich im Differenzspektrum die Merkmale der MVCO-Spezies aus (siehe Spektrum — in Abb. 3.16(a)). Die angezeigten Wellenlängen stimmen mit denen überein, die aus dem Differenzspektrum nach Inkubation des oxidierten Enzyms mit CO erhalten wurden. Grund hierfür ist die Disproportionierung des E-Zustandes in MVCO und oxidierten Zustand. Aus den Differenzspektren wird nicht ganz ersichtlich, wie sich das Elektron im E-Zustand zwischen den Kofaktoren verteilt. Die große Absorption bei 605 nm ist jedoch für eine Häm a -Reduktion indikativ. In Abwesenheit von Sauerstoff besitzt der E-Zustand eine hohe Lebensdauer; sogar nach über einer Stunde ist er noch vorhanden, während im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt exklusiv das MVCO-Enzym vorliegt.

Die Spannungssignale nach Elektroneninjektion in den E-Zustand lassen sich mit zwei Zeitkonstanten beschreiben (Abb. 3.16(b)). Zusätzlich erscheint noch eine Millisekundenphase mit kleiner Amplitude. Diese wird der schon vorhandenen Fraktion an Oxidasemolekülen im MVCO-Zustand zugeschrieben. Wie sich in den spektroskopischen Messungen zeigte, ist zu jedem Zeitpunkt der E-Zustandsbildung eine Schulter bei 592 nm ausgebildet, indikativ für die MVCO-Spezies. Das elektrische Signal des MVCO-Enzyms wird durch eine transiente Elektronenäquibrierung zwischen den Metallzentren nach Photolyse des gebundenen CO ausgelöst (Ruitenberg et al., 2002; Jasaitis et al., 1999).

Abbildung 3.17(a) stellt den Verlauf des elektrischen Signales nach Inkubation mit CO

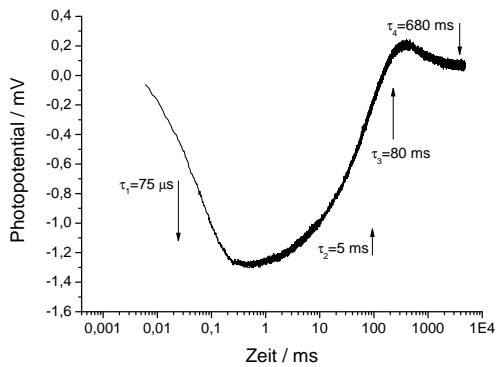


(a) Bildung des E-Zustandes

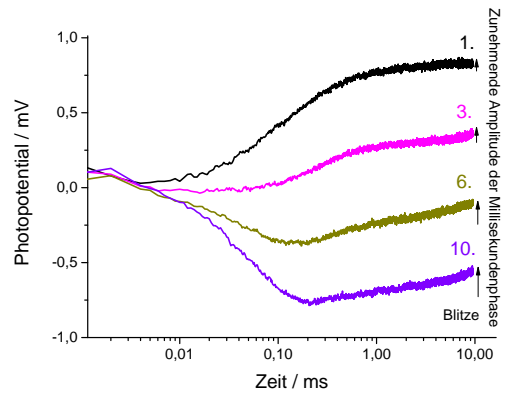


(b) E→R-Übergang

Abbildung 3.16.: (a) Bildung des E-Zustandes bei der N131D-Mutante. Die Differenzspektren zeigen Reaktion von 3,5 μM N131D-COX mit 200 μM H_2O_2 unter anaeroben Bedingungen (N_2 , 50 mM HEPES, pH 7, 4, 0,02% Laurylmaltosid, 2 mM Glukose). Nach 10 min wurden 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glukose-Oxidase und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Katalase zugefügt; anschließend für 5 min mit CO begast. Die Differenzspektren werden zu den entsprechenden Zeiten aufgenommen. (b) Vergleich der elektrometrischen Signale von N131D-, D124N- und WT-COV. Die letzten beiden Proben wurden von M. Ruitenbergs aufgenommen. Bedingungen wie unter (a).



(a) Spannungssignal des MVCO-Enzyms



(b) Mehrfachblitzexperimente beim E→R-Übergang

Abbildung 3.17.: (a) Spannungsantwort des MVCO-Spezies von N131D-COV. Die Proteoliposomen wurden zwei Stunden unter anaeroben Bedingungen in einer CO-Atmosphäre inkubiert. (b) Mehrfachblitzexperiment beim E→R-Übergang von N131D-COV: Unter den Bedingungen wie in Abbildung 3.16(b) wurde mit einer Frequenz von 0,3 Hz mehrmals geblitzt

3. Ergebnisse

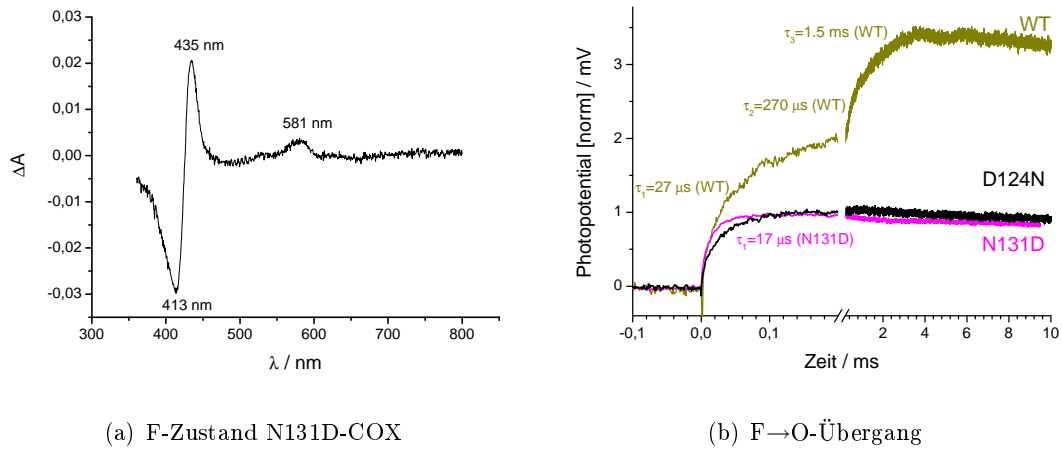


Abbildung 3.18.: (a) Darstellung des F-Zustandes in 50 mM HEPES, pH 7, 4: Zu 1,2 μ M N131D-COX wird ein 50facher Überschuss an Wasserstoffperoxid zugegeben und das dargestellte Differenzspektrum nach 10 min gemessen. (b) Der F \rightarrow O-Übergang der N131D-Mutante im Vergleich zum Wildtyp und der D124N-Mutante (Daten aus Ruitenbergh, 2001). Die Signale sind nach 20-minütiger Inkubation mit 100 μ M H_2O_2 unter Standardbedingungen erhalten worden. Die Kurven sind auf die schnelle Phase normiert.

unter anaeroben Bedingungen nur in Abwesenheit von Rubpy dar. Deutlich ist auch hier die Millisekundenphase festzustellen. Aufschlussreich für die Herkunft dieser Millisekundenphase in den Messungen des E \rightarrow R-Übergangs sind hierbei auch Mehrfachblitzexperimente. Durch die Photoreduktion mit Rubpy wird der Anteil an MVCO-Enzym mit zunehmender Blitzzahl erhöht. Davon werden auch die relativen Amplituden der einzelnen Phasen beeinflusst, d.h. die Millisekundenphase und die negative Phase aus dem Elektronenrückfluss von Häm *a* auf Cu_A werden prominenter. Genau dieses Verhalten spiegelt sich in den Messungen in Abbildung 3.17(b) wider und unterstützt die These über die Herkunft der langsamen Phase im ersten Blitz beim E \rightarrow R-Übergang.

Der F \rightarrow O-Übergang Der P-Zustand war bei der N131D-Mutante auch für spektroskopische Messungen nicht zugänglich. D-Weg Mutanten besitzen gegenüber der Bildung dieses Zustandes eine hohe Instabilität. Messungen mit H_2O_2 zeigen nur transient die Ausbildung einer 609 nm-Spezies und gehen danach über in den F-Zustand. Dieser hingegen lässt sich mit den Standardbedingungen darstellen und besitzt ungefähr die gleiche Stabilität und spektralen Eigenschaften wie der Wildtyp. Abbildung 3.18(a) stellt das Differenzspektrum und die Absolutspektren der N131D-COX vor und nach Peroxidzugabe dar. Die Mutante erreicht eine 80-90%ige Ausbeute an F-Zustand.

In den elektrometrischen Messungen verhält sich die N131D-Mutante wie die klassische D124N-Mutante und entspricht den Ergebnissen in den beiden vorherigen gemessenen Übergängen: Protonenbewegungen, die im D-Kanal verlaufen, sind in beiden D-Kanalmutanten unterdrückt, d.h. gegenüber dem Wildtyp ist die intermediäre und die langsame Phase nicht mehr vorhanden. Der Elektronentransfer in der N131D-Mutante ist im Vergleich zu den beiden anderen Enzymen etwas schneller. Bezüglich des Protonentransfers sind in den elektrometrischen Messungen nur die elektrogenen Protonenaufnahmen

	Wiltyp ¹	D124N ²	N131D
O→E	$\tau_1 = 23,2 \mu\text{s} \pm 5,2 (62 \pm 5)$	$\tau_1 = 19,7 \mu\text{s} \pm 5,2 (58 \pm 4)$	$\tau_1 = 26,4 \mu\text{s} \pm 5,2 (55 \pm 5)$
	$\tau_2 = 230 \mu\text{s} \pm 50 (38 \pm 5)$	$\tau_2 = 162 \mu\text{s} \pm 32 (42 \pm 4)$	$\tau_1 = 210 \mu\text{s} \pm 45 (45 \pm 5)$
E→R	$\tau_1 = 26,9 \mu\text{s} \pm 7,5 (26 \pm 9)$	$\tau_1 = 27,2 \mu\text{s} \pm 8,9 (63 \pm 7)$	$\tau_1 = 60,1 \mu\text{s} \pm 15,2 (57 \pm 8)$
	$\tau_2 = 199 \mu\text{s} \pm 64 (25 \pm 9)$	$\tau_2 = 195 \mu\text{s} \pm 13 (37 \pm 7)$	$\tau_2 = 260 \mu\text{s} \pm 55 (43 \pm 8)$
	$\tau_3 = 1,5 \text{ ms} \pm 0,6 (49 \pm 9)$		
F→O	$\tau_1 = 25,6 \mu\text{s} \pm 7,7 (30 \pm 8)$	$\tau_1 = 24,4 \mu\text{s} \pm 7,5 (100)$	$\tau_1 = 17,8 \mu\text{s} \pm 5,2 (100)$
	$\tau_2 = 269 \mu\text{s} \pm 105 (23 \pm 6)$		
	$\tau_3 = 1,5 \text{ ms} \pm 0,5 (47 \pm 9)$		

¹Werte für E→R und F→O aus Ruitenbergh (2001)

²Werte aus Ruitenbergh (2001)

Tabelle 3.3.: Zusammenfassung der elektrometrischen Messungen an der N131D-Mutante und Vergleich der Zeitkonstanten mit den Werten des Wildtyps und der D124N-Mutante. Die relativen Amplituden der einzelnen Phasen sind in Klammern angegeben.

über den K-Kanal im O→E-Übergang und E→R-Übergang zu beobachten.

Das Ergebnis des F→O-Übergangs unterscheidet sich von den Messungen der entsprechenden Mutanten aus *Rhodobacter sphaeroides*. Hier besaß die D132N ($\hat{=}$ D124N) weiterhin eine verkleinerte intermediäre Phase (Konstantinov et al., 1997). In der N139D ($\hat{=}$ N131D) war die intermediäre Phase sogar mit der gleichen Amplitude wie die des Elektronentransfers vorhanden (Siletsky et al., 2004). Die Unterschiede in den bakteriellen Oxidasen sind bisher nicht verstanden. Tabelle 3.3 fasst nochmals die Messungen an der N131D-Mutante zusammen.

3.2. Die Quinol-Fumarat Reduktase

Eine weitere Art des Protonen gekoppelten Elektronentransfers in Proteinen findet sich bei der QFR aus *Wolinella succinogenes*. Die „E-Weg“-Hypothese (Lancaster, 2002a) erklärt den scheinbaren Widerspruch, dass die Aktivität der QFR nicht zum Aufbau eines Protonengradienten führt (Kröger et al., 2002; Biel et al., 2002; Graf et al., 1985) und gleichzeitig Menaquinoloxidation und Fumaratreduktion durch die Membrandoppelschicht getrennt sind (Lancaster et al., 2000): Die dabei von verschiedenen Seiten der Membran freigesetzten und aufgenommenen Protonen werden zur Wahrung der Elektroneutralität durch zwei Protonen kompensiert, die durch einen transienten Kanal („E-Weg“) von der periplasmatischen zur cytoplasmatischen Seite gelangen. Durch den transienten Charakter des Kanals soll seine Existenz in kinetischen Messungen nachgewiesen werden. Da Einzelschritte der von der QFR katalysierten Reaktion elektrogen sind (s. Abb.3.19), wird diese Problemstellung mit elektrischen Messungen an der *BLM* adressiert.

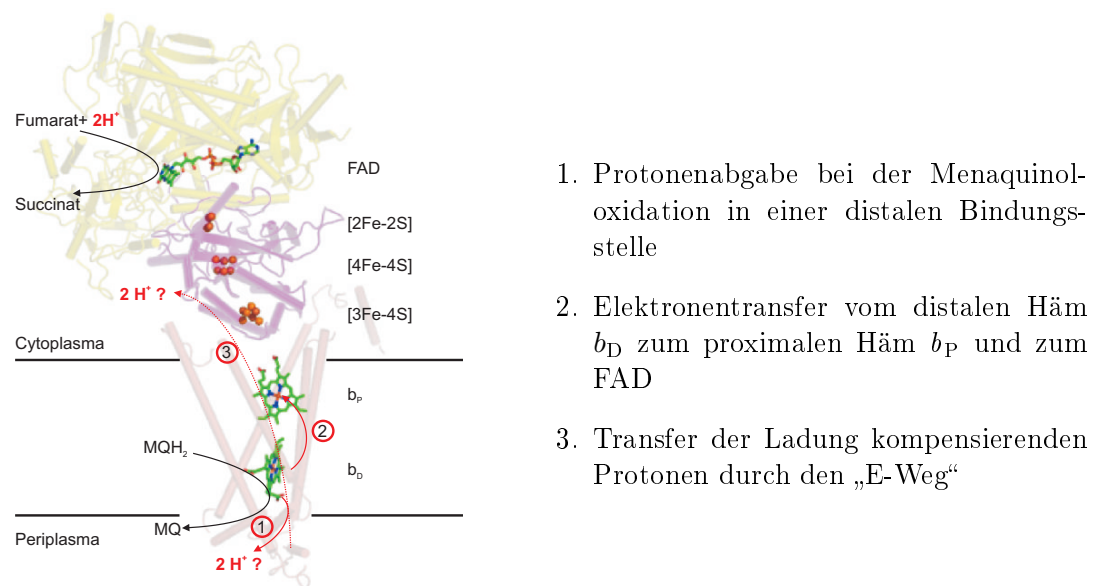


Abbildung 3.19.: Mögliche elektrogene Reaktionsschritte in der QFR katalysierten Fumaratreduktion

Für das Durchführen von kinetischen Experimenten stellt sich das Problem der schnellen Aktivierung der QFR zum Starten der Messungen. Da schnelle Mischtechniken an der *BLM* nicht durchgeführt werden können, wurde hier die Strategie verfolgt, Licht induzierbare Substratsprünge mit sogenannten *caged compounds* durchzuführen (Adams and Tsien, 1993).

3.2.1. Synthese eines caged Fumarates

Caged compounds besitzen die Eigenschaft, dass sie sich durch einen kurzen Lichtblitz photolysieren lassen, um so zu einem Substratsprung in kurzer Zeit zu führen (Kaplan et al., 1978; Fendler et al., 1998). Von den Substraten der QFR wurde Fumarat für die Synthese einer geschützten Verbindung gewählt, da es über seine Carboxylatgruppe leicht

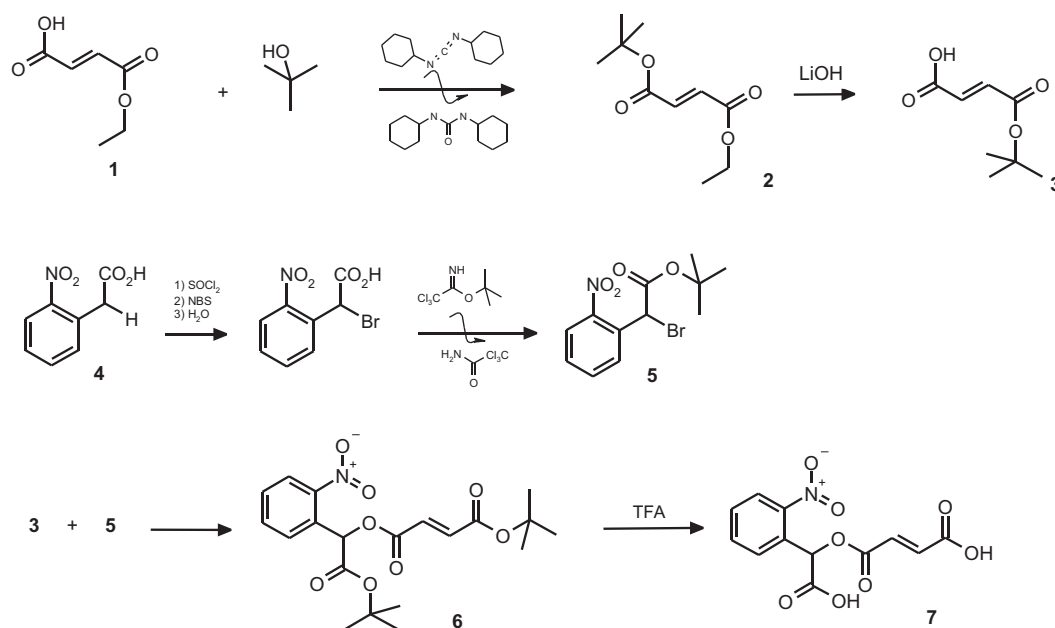


Abbildung 3.20.: Synthesestrategie für *caged* Fumarat. Details der Synthese finden sich im Anhang A.1 auf S. 155 (NBS: N-Bromsuccinimid; TFA: Trifluoressigsäure).

zugänglich für die Kopplung mit der α -Carboxynitrobenzyl-Schutzgruppe (CNB) ist. Eine geschützte Verbindung sollte folgende Eigenschaften für eine Verwendung in biologischen Messungen besitzen:

- Das unphotolysierte Substrat darf von dem zu untersuchenden Enzym nicht verstoffwechselt werden und sollte im Zeitrahmen eines Experimentes nicht hydrolysieren.
- Die Photolyseprodukte der Schutzgruppe dürfen nicht zur Inhibierung des Enzyms führen.
- Die Substratfreisetzung soll schnell gegenüber dem katalytischen Turnover erfolgen.

Synthesestrategie

Als Schutzgruppe wurde CNB gewählt, das schon erfolgreich in verschiedenen Systemen eingesetzt worden ist (Hess, 2003) wie γ -Aminobutansäure (Gee et al., 1994), Glutamat (Wieboldt et al., 1994b), Carbamoylcholin (Milburn et al., 1989), Kainat (Niu et al., 1996) oder Glycin (Grewer et al., 2000). Für Fumarat stellt sich das Problem, dass zwei Carboxylatgruppen mit der CNB-Schutzgruppe gekoppelt werden können. Daher wird als Zwischenstufe ein asymmetrischer Diester gebildet, der nach selektiver Hydrolyse einer Esterbindung mit der aktivierten CNB-Vorstufe gekoppelt werden kann, wie in Abbildung 3.20 zu sehen ist.

Der Monoester Ethylfumarat **1** ist leicht zugänglich und käuflich. Die zweite Säuregruppe kann mit *tert*-Butanol unter Zuhilfenahme des Kopplungsreagenzes Dicyclohexylcarbodiimid verestert werden (Neises and Steglich, 1985). Der so erhaltene asymmetrische

3. Ergebnisse

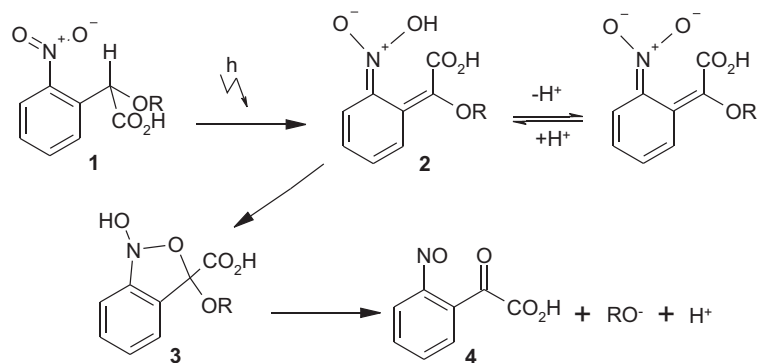


Abbildung 3.21.: Photolysemechanismus von CNB *caged* Verbindungen. Die Säure des Aci-Nitro-Intermediates **2** steht in einem schnellen Gleichgewicht mit seiner korrespondierenden Base. Es zerfällt über intramolekulare Zyklisierung **3** in die Photolyseprodukte **4**. RO^- ist hierbei Fumarat.

Diester der Fumarsäure **2** wird selektiv hydrolysiert (Denmark et al., 1996), um zum *tert*-Butylfumarat **3** zu gelangen: Hier ist nun eine Säuregruppe mit der *tert*-Butylgruppe geschützt, während die zweite für die Kopplung mit der aktivierten CNB-Gruppe **5** zugänglich ist. Die Schutzgruppen werden mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten.

Photolyse des caged Fumarates

Die Photolyse verläuft über eine Zwischenstufe, dem so genannten Aci-Nitro-Intermediat (s. Abb. 3.21, Walker et al., 1988; McCray et al., 1980; Schwörer and Wirz, 2001). Hinsichtlich der Freisetzung des gewünschten Substrates wurde für *caged* ATP gezeigt, dass dieses mit dem Zerfall des Intermediates erfolgt (Barth et al., 1995, 1997). Andere CNB geschützte Substrate begehen jedoch auch einen parallelen Weg über ein Halbacetal (Corrie et al., 2003). Das Aci-Nitro-Intermediat besitzt unterschiedliche spektrale Eigenschaften im blauen Wellenlängenbereich zum Grundzustand und ist daher leicht in transienten spektroskopischen Messungen zu detektieren.

Wird eine Probe mit *caged* Fumarat mit einem Laserblitz von 308 nm photolysiert, sind die transienten Absorptionsänderungen wie in Abb. 3.22 zu beobachten, wie sie für ein Aci-Nitro-Intermediat zu erwarten sind. Unter diesen Bedingungen folgt der Abbau des Intermediates einem zweiphasigen Verlauf, der sich mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 100 \mu\text{s} \pm 10$ (80%) und $\tau_2 = 1,6 \text{ ms} \pm 0,3$ (20%) beschreiben lässt. Die Absorption erreicht nach Photolyse nicht mehr die Grundlinie, da ein Nebenprodukt, die Nitrosobenzylgruppe, im sichtbaren Bereich Licht absorbiert (Grewer et al., 2000). Ein zweiphasiger Abfall des Intermediates wurde schon zuvor bei CNB geschützten Verbindungen beobachtet (Wieboldt et al., 1994a; Niu et al., 1996; Grewer et al., 2000) und deutet auf zwei verschiedene Mechanismen der Freisetzung hin (s. o.).

Wie in Abb. 3.21 dargestellt, untergeht die Säureform des Aci-Nitro-Intermediates die Zyklisierungsreaktion. Der Zerfall insgesamt und damit die Freisetzung des Substrates ist daher pH-abhängig, wie auch schon für verschiedene Substanzen gezeigt worden ist (Milburn et al., 1989; Ramesh et al., 1993). Ebenso nimmt die Zeitkonstante für den Zerfall von *caged* Fumarat mit sinkendem pH-Wert ab, von $\tau_1 = 100 \mu\text{s}$ bei pH 7,4 auf $\tau_1 = 53 \mu\text{s}$ bei pH 6,3.

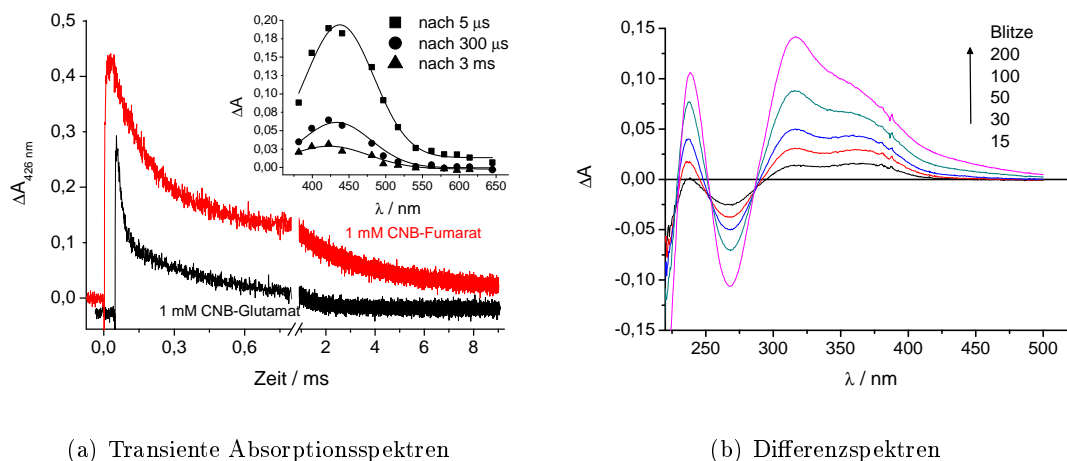


Abbildung 3.22.: Photolyse von *caged* Fumarat bei 308 nm (17 mJ) in 50 mM K-P_i, pH 7,4. (a) Der Aufbau und Abfall des Aci-Nitro-Intermediates wird mit dem Signal von CNB-Glutamat als Kontrolle verglichen. Eingebettet sind die transienten Differenzspektren zu sehen, die zu allen Zeitpunkten dieselbe Form einnehmen. (b) Ebenso sind die Differenzspektren der photolysierten Probe in Relation zur unphotolysierten mit zunehmender Blitzzahl zu sehen.

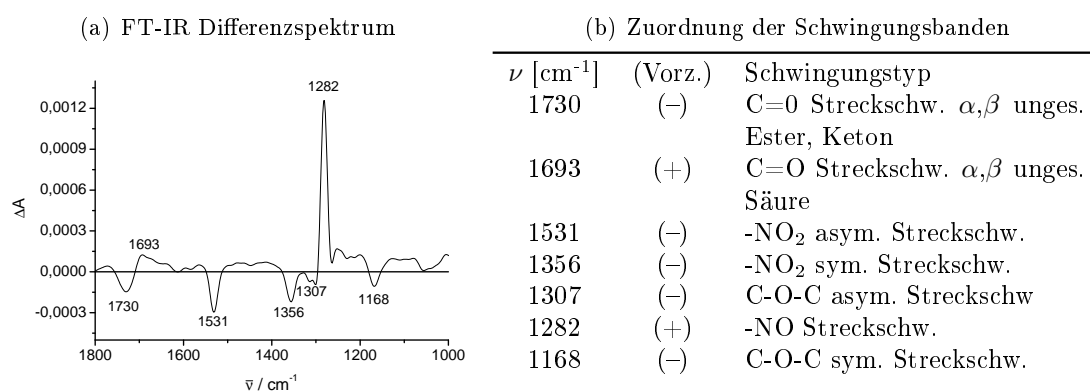


Tabelle 3.4.: (a) FT-IR Differenzspektrum von *caged* Fumarat. Eine Probe von *caged* Fumarat (500 μ M) in Wasser wird durch einen Laserblitz photolysiert. Das Differenzspektrum bezieht sich auf die Daten von photolysiert *minus* unphotolysiert. (b) Die Zuordnung der einzelnen Schwingungen erfolgt anhand von Vergleichsmessungen an CNB und Fumarat, sowie von publizierten Messungen (z.B. Barth and Corrie, 2002).

Die Photolyseprodukte lassen sich mittels Infrarotspektroskopie identifizieren. Im Differenzspektrum nach und vor Photolyse erscheinen charakteristische Gruppenschwingungen, die auf das Verschwinden der unphotolysierten Verbindung bzw. das Auftauchen der Produkte schließen lassen. Sie sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Die Zuordnung der einzelnen Banden ist nicht eindeutig, da es in einigen Bereichen zu spektralen Überlappungen kommt (z.B. die Carbonylschwingungen des *caged* Fumarates werden von den Schwingungen der Produkte, Fumarat und Nitrosoacetophenon, überlagert). Die charakteristischen Schwingungen der Nitrogruppe bei 1531 cm⁻¹ und 1356 cm⁻¹ sind gut zu erkennen.

3. Ergebnisse

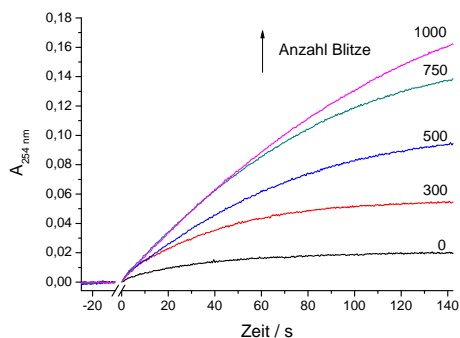


Abbildung 3.23.: Aktivitätstest von QFR mit photolysiertem *caged* Fumarat: Die Aktivitätstests wurden unter Standardbedingungen durchgeführt und mit der Zugabe von QFR-Proteoliposomen gestartet. Statt Fumarat wurde 100 μ M *caged* Fumarat eingesetzt, das aus einer Stammlösung nach zunehmender Anzahl von Laserblitzen entnommen wurde. Mit der Anzahl der Laserblitze steigt die Konzentration an freigesetztem Fumarat. Dieser Zusammenhang ist hier anhand der zunehmenden Rate der Menaquinoloxidation bei $A_{254\text{ nm}}$ zu sehen.

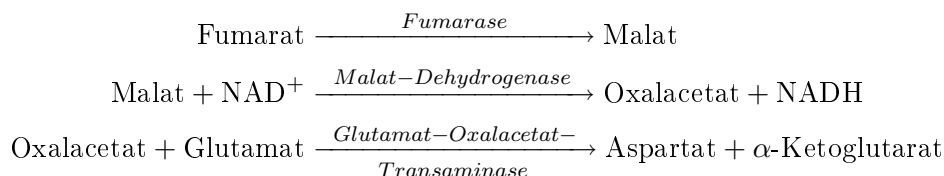
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein *caged* Fumarat für kinetische Messungen an der QFR synthetisiert worden ist. Die Freisetzung des Substrates ist mit einer Zeitkonstante von $\approx 100\text{ }\mu\text{s}$ etwas langsamer als bei anderen CNB geschützten Verbindungen. Die unphotolysierte Substanz ist sehr stabil gegenüber Hydrolyse bei neutralem pH. In den Differenzspektren sowohl im UV/VIS als auch im infraroten Bereich wurden weniger als 5% der Hydrolyseprodukte nach 60 min entdeckt. Ihre Eignung in Bezug auf Messungen an der QFR soll im nächsten Abschnitt untersucht werden.

QFR-Aktivität mit photolysiertem *caged* Fumarat

Ein wesentlicher Aspekt für die Verwendbarkeit des *caged* Fumarat liegt im inerten Verhalten der unphotolysierten Verbindung gegenüber der QFR. Dazu wurde die Aktivität der QFR in Gegenwart und Abwesenheit der unphotolysierten Substanz bestimmt. Es zeigte sich, dass die enzymatische Aktivität mit Fumarat nicht durch die Anwesenheit der geschützten Verbindung beeinträchtigt wird.

Um die Freisetzung von Fumarat und eine mögliche Inhibition durch die Photolyseprodukte zu überprüfen, werden Enzymassays der QFR (s. Abschnitt 2.1.3 auf S. 26) mit einer Lösung von *caged* Fumarat nach zunehmender Anzahl von Laserblitzen gestartet, wie in Abbildung 3.23 zu sehen ist. Mit fortschreitender Photolyse steigt auch die gemessene Aktivität aufgrund der höheren Fumaratkonzentration. Am Ende des Assays wird anschließend eine bekannte Menge Fumarat zugegeben, um einen möglichen Einfluss der Photolyseprodukte zu beobachten. Die darauf gemessene Aktivität war bei allen Zugaben, d. h. mit zunehmender Blitzzahl und damit erhöhter Konzentration an Nebenprodukten gleich. Eine mögliche Beeinflussung konnte also nicht festgestellt werden.

Zu demselben Ergebnis kommt man auch in einem weiteren gekoppelten enzymatischen Test, womit die Fumaratfreisetzung überprüft werden kann. Hier wird die Konzentration des NADH spektrometrisch verfolgt.



In beiden enzymatischen Tests zeigt sich die Freisetzung von Fumarat nach Photolyse bei 308 nm. Sowohl das unphotolysierte Substrat als auch die Nebenprodukte inhibieren

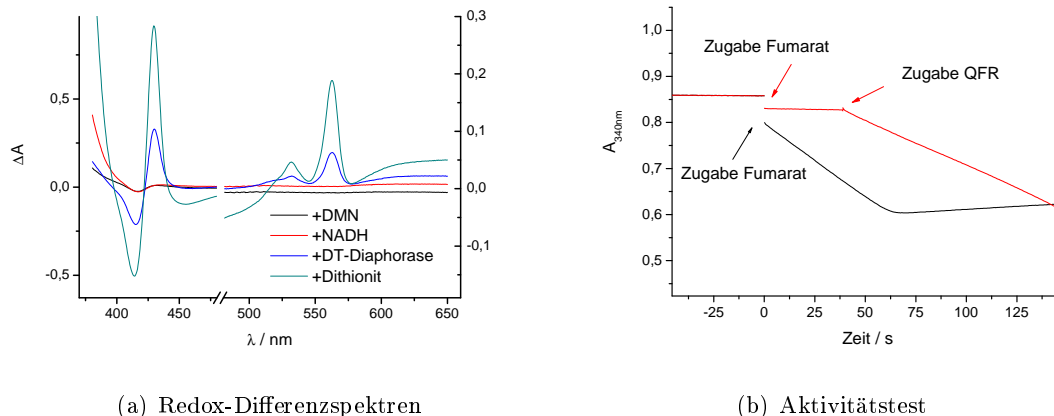


Abbildung 3.24.: (a) Redox-Differenzspektren der Hämgruppen der QFR: Gezeigt sind die Differenzspektren zum oxidierten Enzym nach verschiedenen Zugaben. Die induzierten spektralen Änderungen, die für die α -Bande des Proteins charakteristisch sind ($\Delta\epsilon_{565-575nm} = 21,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), sind vergrößert (rechte Achse) dargestellt. (b) Aktivitätstest von QFR-Proteoliposomen. Bei Verwendung von Diaphorase wird die Oxidation von NADH verfolgt ($\Delta\epsilon_{340nm} = 5,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

bei den verwendeten Enzymsystemen nicht.

3.2.2. Spektroskopische und elektrometrische Messungen an der QFR

Ziel ist es, das oben beschriebene *caged* Fumarat für kinetische Messungen an der QFR zu verwenden. Bisher sind wenige Daten für die einzelnen Reaktionsschritte bekannt, wie etwa *freeze-quench* Messungen, die die Reduktion der einzelnen Kofaktoren nach Menaquinolzugabe untersuchten (Unden et al., 1984, s.a. Abb. 1.6(c) auf S.15), oder voltammetrische Reduktionskinetiken (Jeuken et al., 2002; Hudson et al., 2005).

Reduktion mit Dimethylmenaquinol

QFR benötigt zur Fumaratreduktion ein Menaquinol mit niedrigem Standardpotential (Lemma et al., 1991). Wegen seiner hohen Wasserlöslichkeit wird Dimethylmenaquinol (DMNH_2 , 2,3-Dimethyl-1,4-Naphthoquinol) verwendet. Da reduziertes DMNH_2 in Sauerstoffatmosphäre nicht stabil ist, wird es meist *in situ* mit Borhydrid unter anaeroben Bedingungen erzeugt (Unden et al., 1980). Für elektrometrische Messungen an der BLM kann dieses Verfahren nicht verwendet werden, da der dabei erzeugte Wasserstoff zur Zerstörung der Membran führt. Auch Messungen mit der stabileren Teflonfolie gestalten sich als schwierig. Die Gasblasen streuen das einkommende Laserlicht, was zum einen zu einer starken Reduktion der effektiven Energie an der Membran und zum anderen zu Artefakten an den Elektroden führt. Eine andere Methode stellt die enzymatische Reduktion von DMN unter Aktivität einer Diaphorase dar (Grivennikova et al., 1993). DT-Diaphorase (NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase) katalysiert die Zweielektronen-Reduktion von verschiedenen Quinonen und Naphthoquinonen mit NADH oder NADPH (Nicotinamid-Adenindinukleotid(phosphat)) als Elektronenquelle (Ernster et al., 1962; Lind et al., 1990).

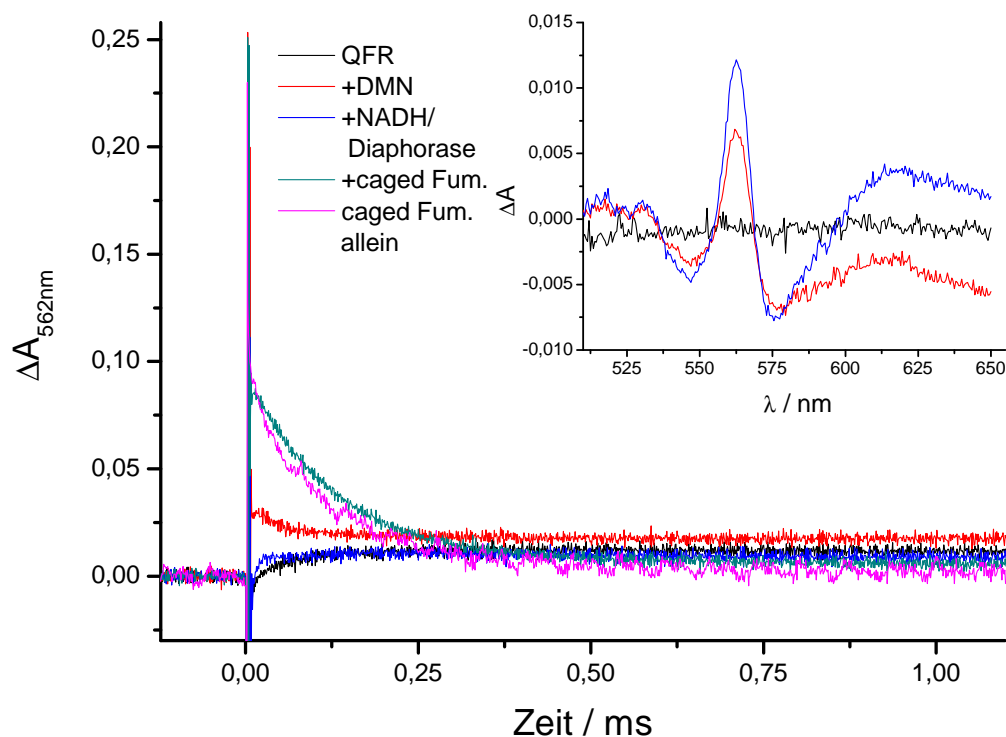


Abbildung 3.25.: Transiente Absorptionsmessungen an QFR ($8\text{ }\mu\text{M}$) in 50 mM K-Pi , pH 7,4 nach verschiedenen Zugaben zum oxidierten Enzym. Es wird der Redox-Zustand der Hämgruppen bei 562 nm verfolgt: Gezeigt sind die Zeitverläufe nach Blitzlichtanregung bei 308 nm (12 mJ) der oxidierten QFR (—), in Gegenwart von $200\text{ }\mu\text{M}$ DMN (—), NADH/DT-Diaphorase (—, reduzierte QFR) und $500\text{ }\mu\text{M}$ *caged* Fumarat (—). Die Signale werden überlagert von der Absorption des Aci-Nitro-Intermediates, die sowohl in An- als auch Abwesenheit der QFR (—) zu sehen ist. In der eingesetzten Grafik ist die Hämreduktion durch Blitzlichtanregung unter den verschiedenen Bedingungen der transienten Absorptionsmessung dargestellt: Die Differenzspektren (nach zehn Blitzen *minus* vor Blitzen) der Proben verdeutlichen die photochemische Reduktion der Hämgruppen (QFR allein —, mit DMN —). Im Vergleich die durch NADH und Diaphorase induzierte Reduktion derselben Probe (—).

In Abbildung 3.24(a) ist die Reduktion der QFR unter der Aktivität des Enzymsystems dargestellt. Maximal werden 50% der Änderungen nach Dithionitzugabe im spektralen Bereich der Hämgruppen erreicht. Dieses Ergebnis stimmt mit den bisherigen Beobachtungen nach Zugabe von Menaquinol (Uden et al., 1980; Uden and Kröger, 1981) und den apparenten Mittelpunktpotentialen der Hämgruppen ($E_{b_h}^0 = -9\text{ mV}$ und $E_{b_l}^0 = -154\text{ mV}$, Lancaster et al., 2000) überein. Reduzierte QFR ist in Anwesenheit von Sauerstoff nicht stabil (Daten nicht gezeigt). Auch unter ständiger Erneuerung des Quinolpools durch die Diaphorase und 1 mM NADH sinkt der Reduktionsgrad innerhalb von Minuten, was weiterhin Arbeiten unter anaeroben Bedingungen notwendig macht.

Die charakteristische Häm-signatur im sichtbaren Bereich ermöglicht das zeitliche Verfolgen von Redoxvorgängen nach Photolyse von *caged* Fumarat. Anregung bei 308 nm

führt jedoch zu unspezifischen Elektronenbewegungen bei Anwesenheit der QFR und DMN (Abb. 3.25). In den Differenzspektren der Proben (nach *minus* vor dem Blitzen) ist die Reduktion der Hämgruppen deutlich zu sehen. Die Elektronenquelle dieser photochemischen Reaktion ist unklar, die Anwesenheit von DMN erleichtert die Hämreduktion. Es ist jedoch von Hämproteinen (Gu et al., 1993; Matysik et al., 2000) und einfachen quinonhaltigen Systemen (Coutts and Paterson, 1986; Cape et al., 2005) bekannt, dass es unter Lichteinfluss zu Redoxprozessen der chromophoren Gruppen kommt. Weiterhin sind zusätzliche Elektronenbewegungen durch Fumaratfreisetzung nicht zu erkennen, da der Hintergrund durch das Aci-Nitro-Intermediat zu hoch ist: In den Proben mit und ohne QFR gibt es bei 562 nm keine Unterschiede. Die Transiente fällt mit der charakteristischen Zeitkonstante für den Zerfall des Intermediates ab (s. Abb. 3.25).

Ein ähnliches Bild wie bei den spektroskopischen Messungen entwickelt sich ebenfalls bei den elektrometrischen Versuchen. Die Artefakte aufgrund der Blitzlichtanregung bei 308 nm gestalten sich als zu groß, um die Daten nach Photolyse von *caged* Fumarat verlässlich und eindeutig interpretieren zu können. In Anwesenheit von DMN entstehen an der Membran enorm große Spannungen (s. Abb. 3.26(a)), 3-5× größer als die mit der COX gemessenen Signale. Der Einfluss der Fumaratfreisetzung auf die Signalamplitude ist, wenn vorhanden, vergleichbar mit den Schwankungen zwischen zwei Blitzen. Auch die erhaltenen Kinetiken sind davon nicht beeinflusst. Um die großen Artefakte an der *BLM* zu vermeiden, wurden verschiedene Wege eingeschlagen. Änderung der Wellenlänge des anregenden Lichtes reduzierte bei Wahl einer längeren Wellenlänge zwar die Artefaktgröße, allerdings wird hierbei auch die Effizienz der Photolyse von *caged* Fumarat herabgesetzt: Man erhält die gleichen Signale wie bei 308 nm, nur kleiner skaliert. Da DMN einen wesentlichen Faktor bei dieser Nebenreaktion darstellte, sollte dessen Konzentration durch Inkorporierung von Naphthoquinonen in den Proteoliposomen selbst gesenkt werden. Tatsächlich lässt sich eine aktive QFR mit Vitamin K₁ zusammen in Liposomen einbauen und mit dem NADH/Diaphorase-System reduzieren (Daten nicht gezeigt). Doch selbst in diesem System sind die Artefakte bei den elektrometrischen Messungen noch zu groß, um kinetische Daten durch einen Fumaratsprung erhalten zu können (Abb. 3.26(b)).

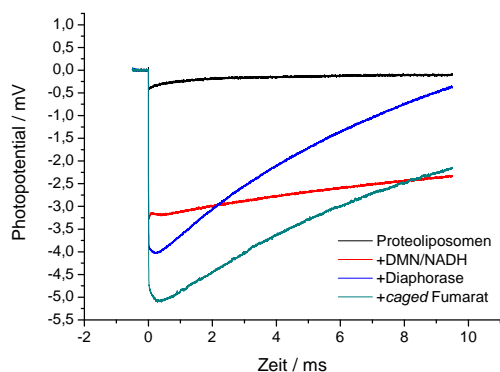
Reduktion mit Dithionit

Die QFR lässt sich auch durch nicht physiologische Substrate reduzieren. Dadurch kann das Problem der durch Quinon hervorgerufenen Artefakte vermieden werden. Vollständige Reduktion wird durch Zugabe des starken Reduktionsmittels Dithionit erreicht. Vom reduzierten Zustand des Enzyms ausgehend soll die Oxidation der Kofaktoren nach einem Fumaratsprung spektroskopisch und elektrometrisch untersucht werden.

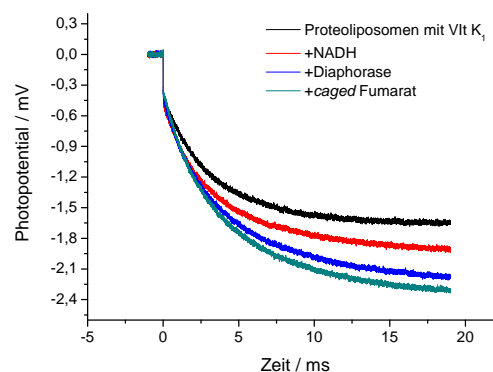
Wie in Abbildung 3.27(a) zu erkennen ist, lässt sich der Elektronentransfer auf die Hämgruppen durch vollständige Reduktion unterdrücken. Dadurch wird die These der photochemischen Reduktion mit DMN als Mediator weiter unterstützt. Ausgehend vom vollständig reduzierten Enzym konnten jedoch keine Oxidationsprozesse nach Photolyse von *caged* Fumarat beobachtet werden (nicht gezeigt). Wie in den Messungen mit dem DMNH₂ reduzierten Enzym (Abb. 3.25) waren die transienten Signale der Aci-Nitro-Intermediates zu groß, um im Spektralbereich der Hämgruppen diese zeitlich verfolgen zu können.

Durch die Reduktion mit Dithionit wird die unspezifische Reduktion der Häme unterbunden, in den elektrometrischen Messungen sind dennoch noch immer große Artefakte zu sehen (Abb. 3.27(b)). Die Anwesenheit von *caged* Fumarat hat auf die Signalf orm, dessen

3. Ergebnisse

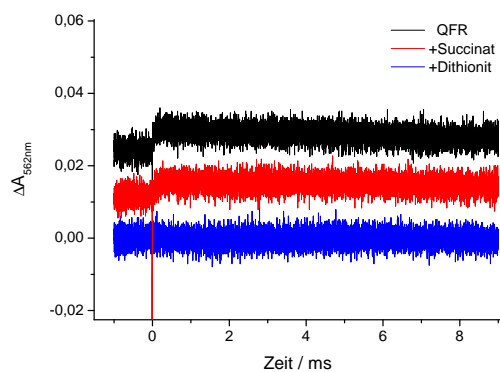


(a) Messungen mit DMN

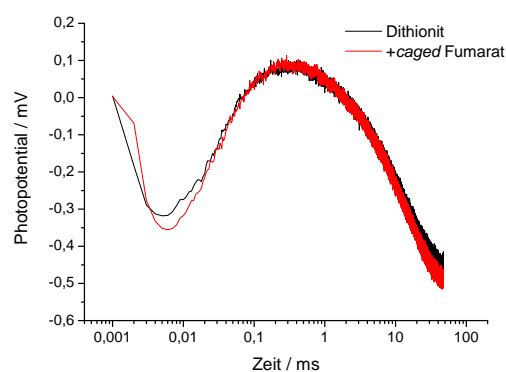


(b) Messungen mit Vitamin K₁

Abbildung 3.26.: Elektrometrische Messungen mit der QFR mit DMN (a) oder Vitamin K₁ (b) als Substrat. Die Kurven zeigen die bei Blitzlichtanregung bei 308 nm erhaltenen Signale unter verschiedenen Bedingungen.



(a) Transiente Absorptionsmessungen



(b) Elektrometrische Messungen

Abbildung 3.27.: (a) Absorptionsmessungen bei 562 nm. In der oxidierten (—) und der teilweise durch Succinat reduzierten (—) QFR findet noch Reduktion der Hämgruppen statt im Gegensatz zur vollständig reduzierten QFR (—). (b) Vergleich der elektrometrischen Messungen an mit Dithionit reduzierter QFR vor und nach *caged* Fumaratzugabe.

Amplitude und Zeitverlauf keinen Einfluss. Entweder ist eine mögliche elektrogene Bewegung ungleich kleiner in ihrer Amplitude gegenüber dem unspezifischen Artefakt, oder der Anteil an freigesetztem Fumarat wird durch die hohe Absorption von Dithionit im ultravioletten Bereich so stark gemindert, dass die freigesetzten Fumaratkonzentrationen zu gering sind, um die QFR schnell zu aktivieren. Die Variation der Dithionitkonzentration ist dabei sehr sensibel, da es kaum möglich ist, die genaue Dithionitkonzentration über einen Zeitraum von Minuten konstant zu halten (Burleigh et al., 1969; Lambeth and Palmer, 1973): So ändert sich das Signal auch in Abwesenheit von Sauerstoff zwischen einzelnen Blitzen beträchtlich, eine erneute Zugabe von Dithionit führt jedoch wieder zu dem hier gezeigten Ausgangssignal, das daher der vollständig reduzierten QFR zugeordnet wird.

Im Ergebnis bleibt festzustellen, dass die Versuche mit dem *caged* Fumarat als aktivierenden Substrat nicht durchgeführt werden konnten. Ausschlaggebend war die Photochemie der verschiedenen Substanzen, die unter für die QFR aktivierenden Bedingungen zugesetzt werden mussten. Zwar ließ sich diese durch eine Anregungswellenlänge von 450 nm vermeiden, hier erfolgte jedoch auch keine Substratfreisetzung. Als chromophore Gruppen kommen insbesondere die verwendeten Naphthoquinone, DMN und Vitamin K₁, sowie das kovalent gebundene Flavinadenindinukleotid (FAD), bzw. die Eisen-Schwefel-Cluster der QFR in Betracht. Beide bilden effizient den Tripletzustand, von dem aus Redoxreaktionen stattfinden (Balakrishnan et al., 1996; Balakrishnan and Umapathy, 1999; Tollin, 1995). Um interne Protonenbewegung in der QFR eventuell detektieren zu können, wurden auch Messungen an der SSM (*solid supported membrane*, Pintschovius and Fendler, 1999) durchgeführt, bei der der Substratsprung durch Mischen und nicht durch Photolyse erfolgt. Dabei konnten keine QFR spezifischen Signale entdeckt werden. Aufgrund der geringeren Zeitauflösung und der Elektroneutralität der von der QFR katalysierten Gesamtreaktion kann dieses negative Ergebnis die „E-Weg“-Hypothese nicht ausschließen.

3.3. Der bc_1 -Komplex

Für den bc_1 -Komplex ergibt sich eine ähnliche Fragestellung und Vorgehensweise wie für die Quinol-Fumarat Reduktase: Zunächst muss eine schnelle Aktivierung etabliert werden, um kinetische Messungen, seien es spektroskopische oder elektrometrische an der *BLM*, durchführen zu können. Abbildung 3.28 fasst die elektrogenen Protonenbewegungen zusammen. Wie in Abschnitt 1.4.3 auf S. 21 erläutert, ist bisher unklar, wodurch die Protonenbewegungen limitiert sind: in der Diffusion der Substrate oder einer mechanistischen Kontrolle. Dieses lässt sich durch eine schnelle Aktivierung mittels organometallischer Rutheniumverbindungen umgehen, die bei Anregung zur Photoreduktion oder Photooxidation des bc_1 -Komplexes führen. Die strukturellen Einblicke, gepaart mit der Zugänglichkeit von Hefemutanten in den Protonenwegen erlauben eine gezielte kinetische Studie am bc_1 -Komplex, weshalb hier ein System für elektrometrische Messungen etabliert werden soll.

Cytochrom *c* Oxidase und bc_1 -Komplex besitzen beide eine Cytochrom *c* Bindungsstelle, an die positiv geladene Rutheniumkomplexe binden können. Für den bc_1 -Komplex sind bisher noch keine elektrometrischen Messungen an der *BLM* durchgeführt worden, die durch eine schnelle Photooxidation oder -reduktion durch einen angeregten Rutheniumkomplex gestartet worden sind. Voraussetzung ist jedoch zunächst die Synthese der in der Literatur verwendeten Rutheniumkomplexe, um zeitaufgelöst Elektronen- und Protonenbewegungen im bc_1 -Komplex beobachten zu können (siehe Abb.3.28). Sadoski et al. (2000) erwähnte eine fünf Mal höhere Effizienz der Elektronenübertragung im Vergleich zum käuflichen Rubpy bei Verwendung eines dimeren Rutheniumkomplexes, Bis-[(2,2')-Bipyridyl-(2,2'-4',4''-2'',2'')-Quaterpyridin-Ruthenium-(II)]-Tetrahexafluorophosphat (Ru_2Q). Ebenso ist von derselben Gruppe die Verwendung eines Cytochrom *c* beschrieben worden, das mit einem Bisbipyrazin-Bipyridin ligierten Rutheniumkomplex kovalent verknüpft wurde. Dieser ist insbesondere für Photooxidationsstudien interessant (Engstrom et al., 2003).

3.3.1. Synthese und Charakterisierung von Ru_2Q

Synthese von Ru_2Q

Die Synthese verläuft nach dem Reaktionsschema in Abbildung 3.29, wobei die genaue Synthesevorschrift im Anhang beschrieben ist (siehe Anhang A.2 auf S.156).

Die Chlorierung von 1-Bipyridinoxid **1** verläuft heftig und führt zu dem Isomerengemisch aus 4- und 6-Chlorobipyridin. Dieses lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten der beiden Isomere zur Komplexbildung von Nickelionen auftrennen. Das 4-Chlorobipyridin **2** verbleibt bei Nickel(II)-Zugabe in wässriger Lösung und wird nach Abtrennung des zweiten Isomers mit Cyanid freigesetzt. Anschließend erfolgt der wichtigste Reaktionsschritt in der Synthese. Je zwei 4-Chlorobipyridinmoleküle werden über eine reduktive Kopplung miteinander zu dem vierzähligen Quaterpyridin **3** verbunden. Hierbei wird der Katalysator, der aktivierte Nickelkomplex, *in situ* erzeugt (Iyoda et al., 1990). Die Bildung des dimeren Rutheniumkomplexes **5** verläuft danach über eine stufenweise Komplexbildung **4** von Rutheniumtrichlorid.

Das 1H -NMR Spektrum von Quaterpyridin (Abb.3.30(a)) stimmt mit den berichteten Daten überein (Downard et al., 1991). Deutlich ist die Entschirmung der Protonen am Pyridin zu erkennen, das mit dem zweiten Bipyridin verbunden ist. Diese entsteht durch die Ausweitung des π -Elektronensystems und ist somit ein Indikator für den aromatischen

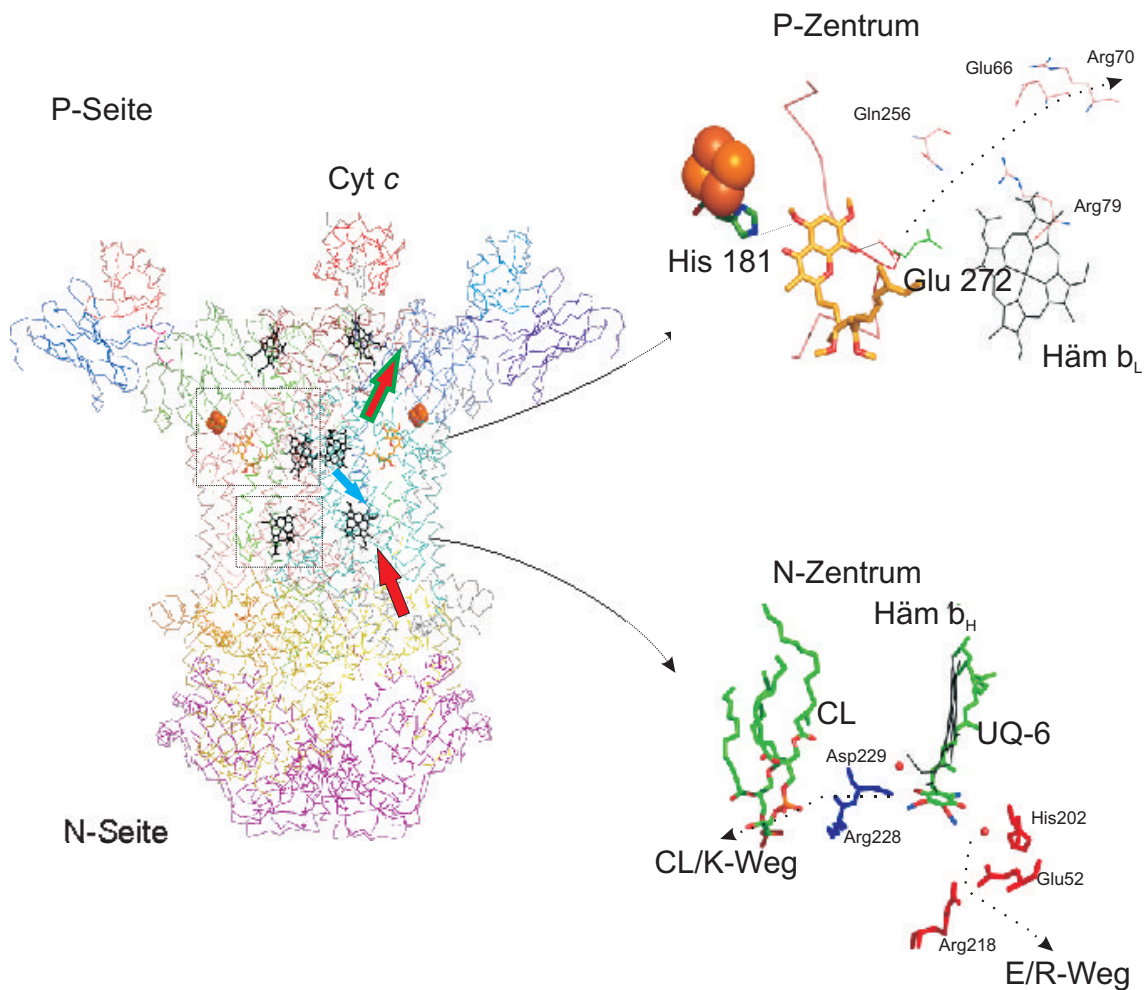


Abbildung 3.28.: Protonentransferwege im bc_1 -Komplex: In der Gesamtansicht sind die elektrogenen Protonenbewegungen mit roten Pfeilen, der elektroneutrale Elektronentransfer zwischen Häm b_L und b_H mit einem blauen Pfeil und der möglicherweise elektrogene Elektronentransfer zum c_1 durch die grüne Umrandung angedeutet. Im P-Zentrum sind die primären Elektronenakzeptoren His180, ein Ligand des Eisen-Schwefel-Zentrums, und Glu272 gezeigt, wie sie zu Stigmatellin Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Glu272 wurde in zwei Konformationen beobachtet: Rot ist die Seitenkettenkonformation bei Bindung des Quinolanalogs Stigmatellin (Hunte et al., 2000) und grün bei Bindung des Semiquinonanalogs HHDBT (Palsdottir et al., 2003). Diese Rotation öffnet den Protonentransferweg, der mit dem gepunkteten Pfeil angedeutet ist.

Im N-Zentrum sieht man die natürliche Substrate UQ-6 und das fest gebundene Cardiolipin (CL). Die beiden Protonenwege öffnen sich ausgehend von den gebundenen Wassermolekülen (rote Punkte) zu beiden Seiten des UQ-6.

3. Ergebnisse

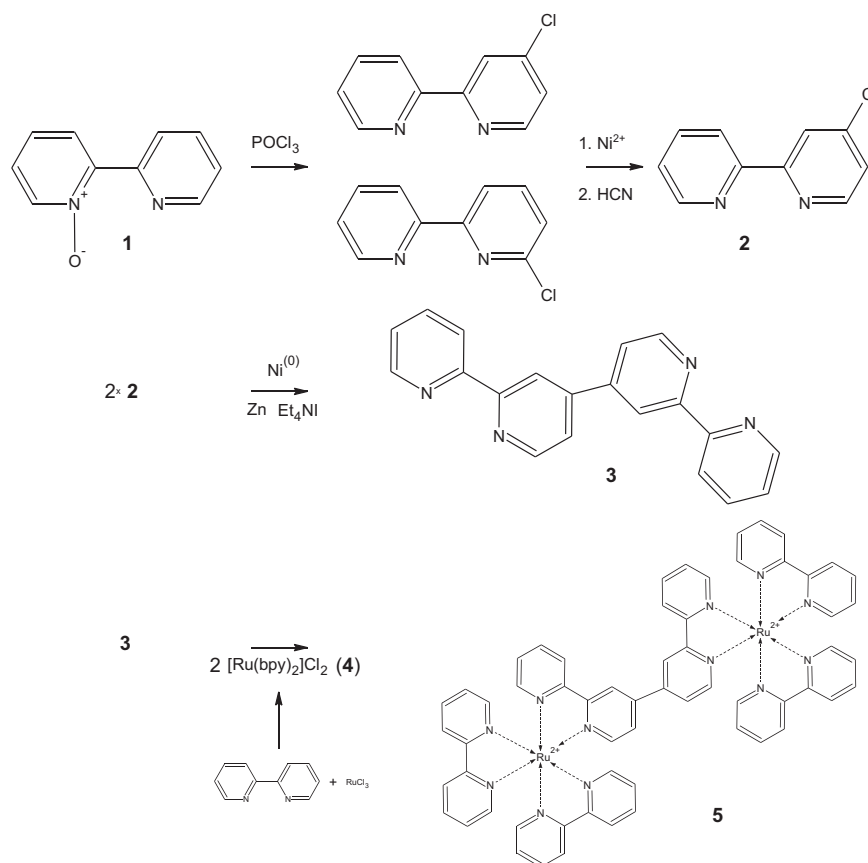


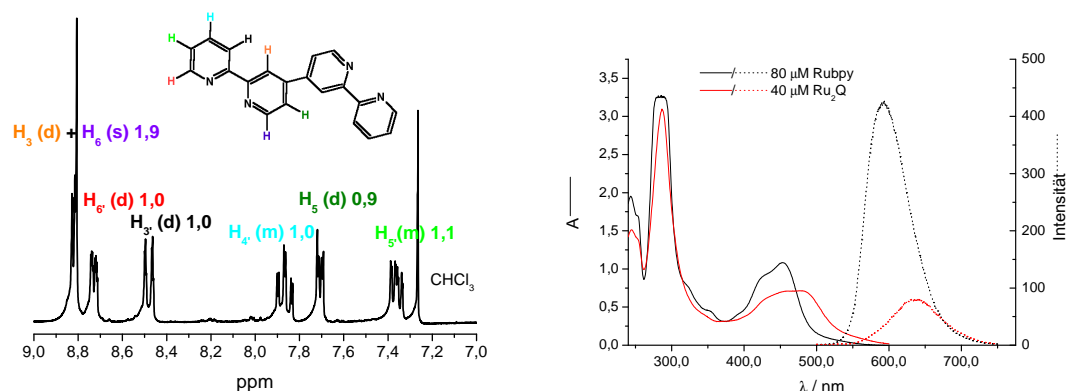
Abbildung 3.29.: Synthesestrategie für Ru_2Q . Für Details siehe Text.

Charakter des Quaterpyridins. Das elektronische Absorptionsspektrum zeigt eine Rotverschiebung im Vergleich zu Rubpy beim energetisch niedrigsten Übergang, einem *metal to ligand charge transfer* (MLCT) Übergang. Die geringere Energie dieses Übergangs wurde als Indiz für eine schwache Wechselwirkung zwischen den beiden Rutheniumatomen in Ru_2Q aufgrund der elektronischen Kopplung durch den vierzähligen Liganden interpretiert. Im Vergleich hierzu ist der $\pi - \pi^*$ Übergang bei 280 nm nicht beeinflusst.

Photoreduktion der COX durch Ru_2Q

Als funktionelle Überprüfung wird die Photoreduktion der COX durch Belichtung in Gegenwart von Ru_2Q durchgeführt. In Abbildung 3.31 sind sowohl die spektroskopischen als auch die elektrometrischen Messungen zu sehen.

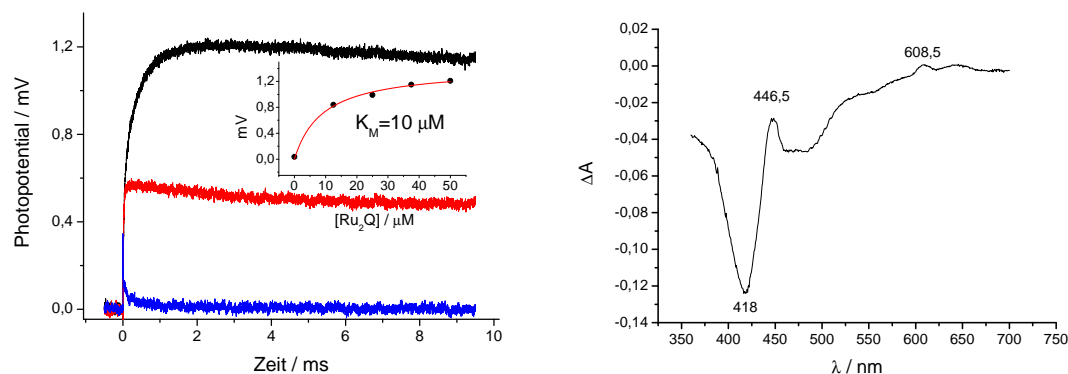
Die Verwendung von Ru_2Q in transienten Absorptionmessungen ist auch für die COX schon in der Literatur beschrieben worden (Zaslavsky et al., 1998). Im Vergleich zum gewöhnlich verwendeten Rubpy sind keine Unterschiede in der Kinetik des Elektronen- und Protonentransfers bei den hier gezeigten elektrometrischen Messungen festzustellen. Die Protonenphase lässt sich wie gewohnt mit Cyanid unterbinden, die Elektronenphase durch Erhöhung der Ionenstärke, wodurch die elektrostatische Bindung des Rutheniumkomplexes an der Cytochrom *c* Bindungsstelle abgeschwächt wird. Aus der Konzentrationsabhängig-



(a) 250 MHz ^1H -NMR Spektrum von Quaterpyridin.

(b) Absorptions- und Emissionsspektren

Abbildung 3.30.: Synthese von Quaterpyridin und Ru_2Q : Charakterisierung der Produkte durch spektroskopische Methoden. In (a) ist das 250 MHz ^1H -NMR Spektrum von Quaterpyridin in CDCl_3 , sowie die Zuordnung der einzelnen Protonensignale und die Integration der Signalintensitäten zu sehen. Die Absorptions- und Emissionsspektren von Ru_2Q und Rubpy in 50 mM K-P_i, pH 7,4, sind in (b) gezeigt. Die Emissionsspektren (gestrichelte Linien) sind bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm aufgenommen worden.



(a) Elektrometrische Messungen an der COX

(b) Differenzspektrum

Abbildung 3.31.: Photoreduktion von COX durch Ru_2Q : In den elektrometrischen Messungen in (a) ist der $\text{O} \rightarrow \text{E}$ -Übergang (—) mit Ru_2Q als Elektronendonator gezeigt, sowie die funktionale Inhibition durch Cyanid (—) und die Unterdrückung der Bindung von Ru_2Q an die COX durch Zugabe von 200 mM KCl (—). Die kleine Graphik zeigt die Konzentrationsabhängigkeit von der Ru_2Q Konzentration. (b) Differenzspektrum nach *minus* vor Blitzlichtanregung von 4 μM COX und 20 μM Ru_2Q . Die ausgewählten Wellenlängen zeigen die Reduktion von Häm *a*.

3. Ergebnisse

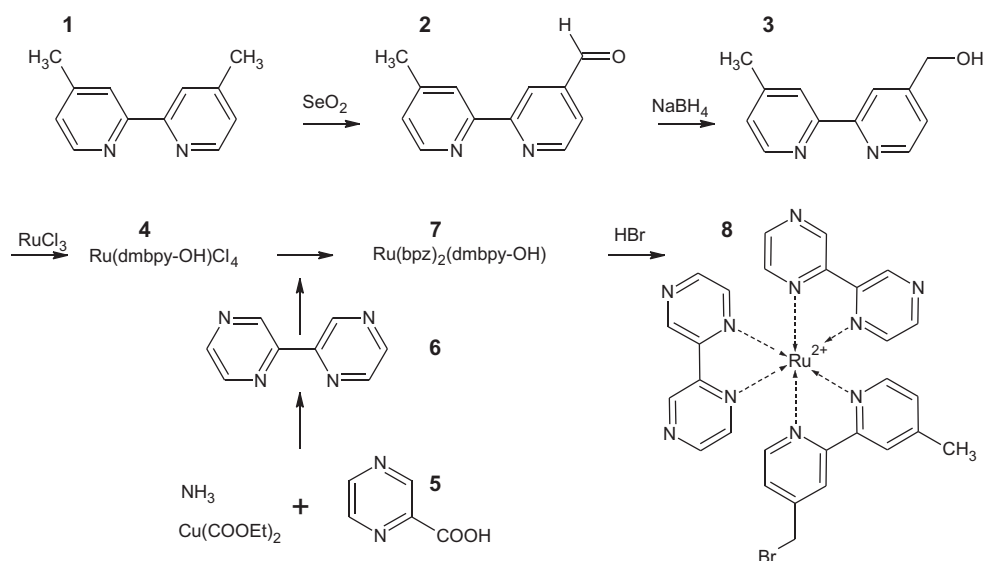


Abbildung 3.32.: Synthesestrategie für $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ (Details s. Text; dmbpy – Dimethylbipyridin **1**; bpz – Bipyrazin **6**).

keit der Gesamtamplitude lässt sich die Bindungskonstante von $\approx 10 \mu\text{M}$ abschätzen (siehe eingefügte Graphik in Abb. 3.31(a)), was etwas geringer als der Literaturwert von $25 \mu\text{M}$ ist. Die erfolgreiche Photoreduktion kann ebenfalls am Differenzspektrum einer Oxidaseprobe nach 20 Laserblitzen beobachtet werden (siehe Abb. 3.31(b)). Neben der Häm *a* Reduktion fällt noch ein leichtes Ausbleichen von Ru_2Q im Wellenlängenbereich zwischen 520 nm bis 470 nm auf, wie ein Vergleich mit dem Absorptionsspektrum nahe legt (s. Abb. 3.30(b)).

3.3.2. Synthese von $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ und Verknüpfung mit Cytochrom *c*

Synthese von $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$

$\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ ist die aktivierte Vorstufe für die Kopplung mit Cytochrom *c*. Die Besonderheit liegt in den zwei Bipyrazinmolekülen, die als vier der sechs Liganden des zentralen Rutheniumatom fungieren. Die Anwesenheit von Bipyrazin erhöht die Oxidationsstärke des angeregten Rutheniumkomplexes beträchtlich im Vergleich zum Trisbipyridinkomplex ($1,22 \text{ V}$ gegenüber $0,79 \text{ V}$, [Jengstrom2003-2816], und somit eignet er sich besonders für Photooxidationsstudien.

Das Syntheschema ist in Abb. 3.32 gezeigt. Die genauen Syntheseschritte finden sich im Anhang (A.3) auf S. 158. In den ersten Schritten wird die Seitenkette des Bipyridinliganden so modifiziert, dass die Methylseitenkette von Dimethylbipyridin **1** nach Oxidation mit Selendioxyd zum Aldehyd **2** und anschließender Reduktion zum Alkohol **3** funktionalisiert vorliegt. Bipyrazin **6** entsteht in einer Pyrolyse des Kupfer(II)-Salzes von Pyrazincarbonsäure **5**. Der sechsfach koordinierte organometallische Rutheniumkomplex **7** entsteht in schrittweiser Zugabe der Liganden. Zuletzt wird die Seitenkette bromiert, um die Nukleophilität zu erhöhen, und man gelangt zum gewünschten Produkt **8**.

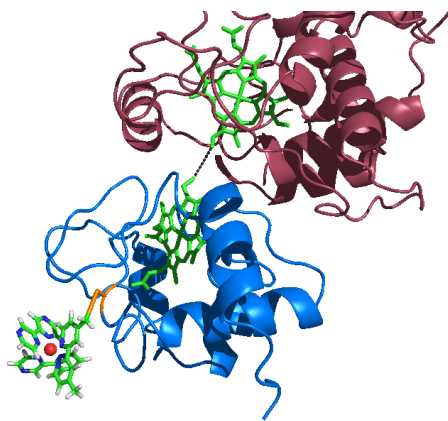


Abbildung 3.33.: Bindung von $\text{Ru}_{\text{bpz}}\text{-H39C-Cc}$ an den bc_1 -Komplex: Der Rutheniumkomplex (*sticks*) ist über H39C an Cytochrom c (blau) an der gegenüberliegenden Seite der Bindungsstelle für den bc_1 -Komplex (rot) gekoppelt (Lange and Hunte, 2002). Die Distanz von 9,4 Å zwischen den beiden Hämgruppen (grün) von Cytochrom c_1 und Cytochrom c (schwarze Linie) ermöglicht einen schnellen Elektronentransfer durch Photooxidation von $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$.

Kopplung von $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ mit Cytochrom c

Zur selektiven Kopplung mit Cytochrom c aus Hefe müssen zwei Mutationen durchgeführt werden: Eine entfernt das native Cystein, während die andere eine Kopplungsstelle distal zur Bindungsstelle am bc_1 -Komplex einführt (Geren et al., 1995; Wang et al., 1996). Dadurch wird der Elektronentransfer zwischen dem bc_1 -Komplex und dem mit $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ gekoppelten Cytochrom c ($\text{Ru}_{\text{bpz}}\text{-H39C-Cc}$) nicht behindert (siehe Abbildung 3.33). Die Mutante H39C;C102T Cytochrom c wurde von Dr. Tina Wenz (MPI für Biophysik) hergestellt und isoliert.

Anregung des gebundenen Rutheniumkomplexes führt zur schnellen Photooxidation. Die entsprechenden spektroskopischen Messungen sind in Abb. 3.34 gezeigt. In den transienten Messungen ist die Oxidation von Cytochrom c an der Abnahme der Absorption bei 550 nm zu beobachten. Die schnelle Phase ist zeitlich nicht vollständig aufgelöst aufgrund der starken Lumineszenz des $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$. Im Differenzspektrum hingegen ist der oxidierende Einfluss auf den Reduktionsgrad des mit Ascorbat reduzierten Cytochrom c deutlicher zu erkennen. Nach 25 Blitzen sind hier die spektralen Signaturen des reduzierten Cytochrom c im Differenzspektrum ausgeprägt, insbesondere die Minima der α - und β -Bande bei 520 und 550 nm.

3.3.3. Photooxidation und Photoreduktion des bc_1 -Komplexes

Reduktionsgrad des bc_1 -Komplexes in Proteoliposomen

Das letztliche Ziel für dieses Teilprojekt sind die elektrometrischen Messungen am bc_1 -Komplex durch Anregung der oben beschriebenen Rutheniumkomplexe. Für die Interpretation möglicher Signale ist es unerlässlich, den Reduktionsgrad des bc_1 -Komplex unter denselben Bedingungen wie an der *BLM* zu bestimmen. Neben den Normalpotentialen der metallischen Kofaktoren im bc_1 -Komplex spielen noch die lipidische Umgebung der Proteoliposomen, die verwendeten Reduktionsmittel (Quinole) und deren Zugänglichkeit zu den Quinolbindungsstellen bei Messungen in der *BLM*-Küvette eine entscheidende Rolle.

Rekonstitution Für die Rekonstitution in Proteoliposomen wurde ein abgewandeltes Protokoll der Cytochrom c Oxidase verwendet (Leung and Hinkle, 1975). Der bc_1 -Komplex kann mit einer Reihe verschiedener Lipidmischungen funktional rekonstituiert werden. Es wurden für die elektrometrischen Messungen Lipide aus *E. coli* und eine Kombination

3. Ergebnisse

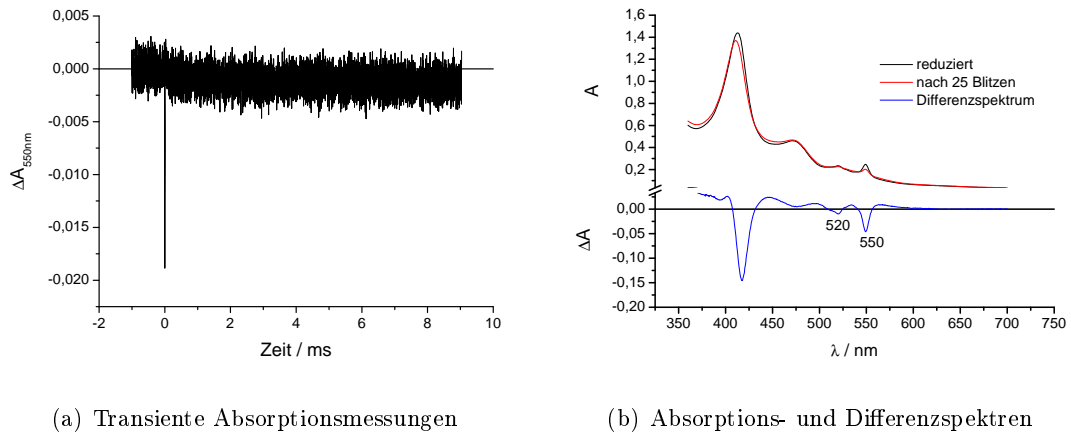
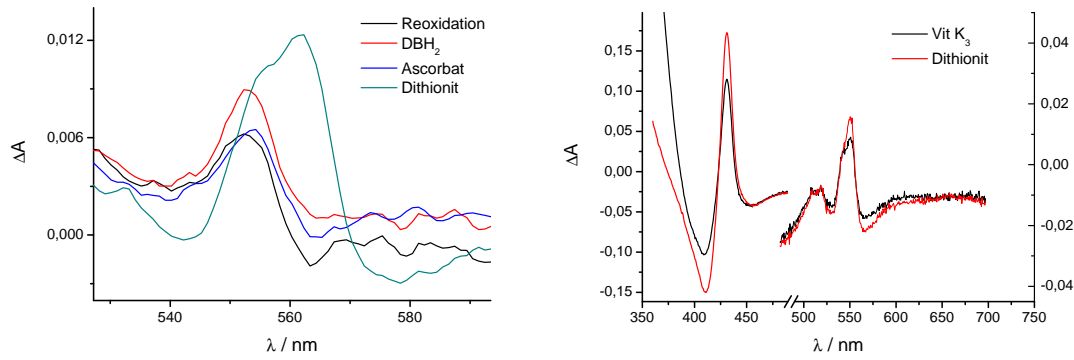


Abbildung 3.34.: Photooxidation von $\text{Ru}_{\text{bpz}}\text{-H39C-Cc}$: (a) Transiente Absorptionsmessungen bei 550 nm nach Anregung durch einen Laserpuls bei 450 nm (2 mJ). (b) Absolut- und Differenzspektren derselben Probe wie in (a) vor und nach 25 Blitzen. Bedingungen: 50 mM K-P_i , pH 7,4; 10 μM $\text{Ru}_{\text{bpz}}\text{-H39C-Cc}$; 25 μM Ascorbat.

aus synthetischen Lipiden (DOPE/DOPC/Cardiolipin, 4:1:0,07 [n/n]) verwendet. Der bc_1 -Komplex wurde dabei zu mehr als 80 % mit der Cytochrom c -Bindungsstelle nach außen (*right side out*) in die Liposomen eingebaut, wie anhand der Cytochrom c_1 Reduktion in Ab- und Anwesenheit von Detergens bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Cytochrom c -Reduktase-Aktivität der Proteoliposomen bewegte sich im Rahmen von 80-140 Elektronen pro Sekunde und war sensitiv gegenüber Entkopplern, wobei die Steigerung der Cytochromreduktionsrate ≈ 2 bei Zugabe von Protonophoren betrug. Interessant ist die hohe nichtenzymatische Reduktionsrate von Cytochrom c durch DBH_2 in Anwesenheit von *E.coli* Lipiden, die in Messungen mit leeren Liposomen bis zu 20 % der durch den bc_1 -Komplex katalysierten Reaktion ausmacht und auch schon zuvor beobachtet worden ist (Rich and Bendall, 1979; Rich and Clarke, 1982). Damit einher geht auch die Beobachtung, dass Cytochrom c_1 des bc_1 -Komplexes im Laufe der Rekonstitution reduziert wird. In verschiedenen Ansätzen konnte 20-50 % des Gesamtcytochrom c_1 durch Ferricyanid reoxidiert werden (Abb. 3.35). Die Elektronenquelle für diese Nebenreaktionen bleibt unklar. Während für die nichtenzymatische Reaktion ein positiver Effekt durch Anwesenheit einer lipidischen Phase mit einer effektiven Konzentrationserhöhung des Decylubiquinols (DBH_2) erklärt werden kann, hat dieses Argument für die Cytochrom c_1 Reduktion keine Gültigkeit. Reduktionsäquivalente können aufgrund von peroxidativen Nebenreaktionen der Lipide entstehen oder in den Lipidpräparationen noch vorhanden sein, wie z.B. Quinole oder andere lipophile Substanzen. Tatsächlich ist diese endogene Cytochrom c_1 Reduktion in Proteoliposomen aus *E.coli* Lipid ausgeprägter als in den reineren synthetischen Lipidmischungen. Dies mag im Vergleich zur COX erstaunen, die für diese Art der Reduktion nicht suszeptibel ist. Doch greift hier der oxidierende Einfluss von molekularem Sauerstoff als Substrat der COX viel stärker als beim bc_1 -Komplex.

Redox-Differenzspektren In Abbildung 3.35 kann der Einfluss verschiedener Substrate auf die Redox-Differenzspektren beobachtet werden. Für die elektrometrischen Messungen



(a) Reduktion des bc_1 -Komplex durch DBH_2 (b) Reduktion des bc_1 -Komplex durch Vitamin K_3

Abbildung 3.35.: Proteoliposomen mit bc_1 -Komplex: In (a) ist die Reoxidation der Proteoliposomen durch Ferricyanid zu beobachten. Insgesamt werden 44 % an Cytochrom c_1 bei Anwendung eines Extinktionskoeffizienten von $\Delta\epsilon_{553-559\text{nm}} = 18,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Siedow et al., 1978; Yu et al., 1972) reoxidiert, gemessen am Ascorbat *minus* Ferricyanid induzierten Redox-Differenzspektrum. Nach Inkubation mit $40 \mu\text{M}$ DBH_2 erhöht sich die Ausbeute auf 67 %. Die Redox-Differenzspektren aller Hämkomponenten sind nach Dithionitzugabe zu beobachten. Die Häm b -Reduktion kann mit $\Delta\epsilon_{563-578\text{nm}} = 28,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ aus dem Dithionit *minus* Ascorbat berechneten Differenzspektrum ermittelt werden (Siedow et al., 1978; Berden and Slater, 1970). Bei Verwendung von Menadion (Vit K_3 , 2-Methyl-1,4-Naphthoquinon) lässt sich der Anteil an reduziertem Cytochrom b auf 65% erhöhen (Abb.(b); s. Text).

ist es wichtig, Auskunft über den Redoxzustand der einzelnen Kofaktoren zu besitzen, um entsprechend der Durchführung von Photooxidations- bzw. Photoreduktionsexperimenten die Ausbeute an einzelnen Zuständen durch Zugabe von Redoxpuffern zu erhöhen. Für Photoreduktionsexperimente führt die Zugabe von Ferricyanid zu einem oxidierten Cytochrom c_1 . Schwieriger gestaltet sich hingegen die Einstellung des Ausgangszustandes für Photooxidationsmessungen: Um eine große Population in den kinetischen Messungen zu oxidieren, sollte das Quinolsubstrat einen hohen Prozentsatz der Häme reduzieren. Die Anwesenheit von DBH_2 reduziert zwei Drittel an Cytochrom c_1 , zeigt jedoch nur eine geringe Wirkung auf die b -Häme.

Reduktion mit Menadion Die Ausbeute an reduziertem Häm b lässt sich durch Verwendung eines Quinols mit höherem Reduktionspotential steigern. Naphthoquinone wie Menadion besitzen im Vergleich zu Ubiquinolen wie DBH_2 ein Normalpotential von $E'_0 = 0 \text{ mV}$ (Rich and Bendall, 1979) gegenüber $E'_0 = 90 \text{ mV}$ (Snyder and Trumpower, 1998; Rich, 1984). Dadurch lassen sich zwei Drittel des Häm b Pools reduzieren (s. Abb. 3.35 b). Das Arbeiten mit Menadion richtet sich nach den Protokollen für die QFR und ihrer Reduktion durch Menaquinon (s. Abschnitt 3.2.2 auf S. 63). Dabei wird das Menadion *in situ* durch die Aktivität der DT-Diaphorase und NADH reduziert. In Bezug auf den bc_1 -Komplex kann die Reduktion der Häme auch in Gegenwart von Sauerstoff durchgeführt werden, obwohl diese Zustände nicht stabil sind und im Zeitraum von Minuten reoxidieren. Das Arbeiten unter anaeroben Bedingungen erhöht deutlich die Lebenszeit der reduzierten Häme und des reduzierten Menadions. Statt Menadion lassen sich auch andere Naphthoquinonderiva-

3. Ergebnisse

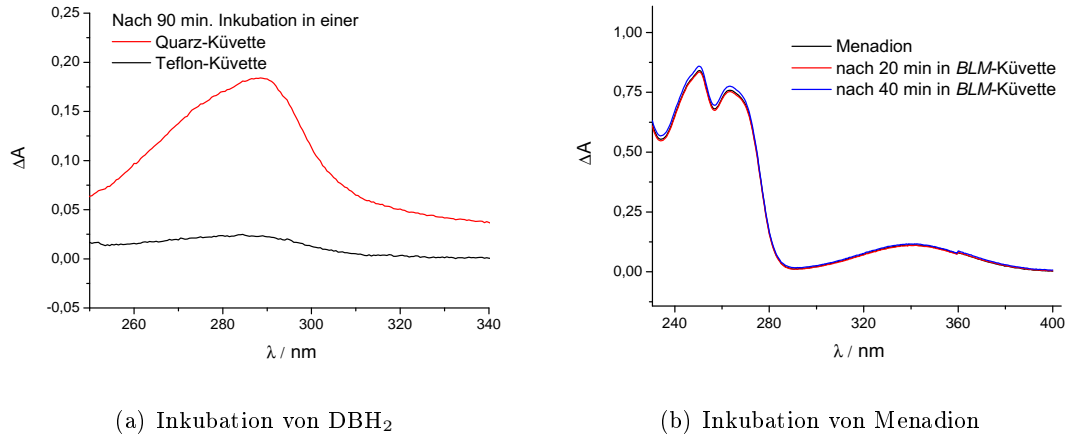


Abbildung 3.36.: Je $40\text{ }\mu\text{M}$ von DBH_2 oder Menadion werden unter Standardbedingungen in einer *BLM*-Küvette aus PTFE inkubiert. In (a) wird dieselbe quinolhaltige Stammlösung einmal in einer *BLM*-Küvette und zum Vergleich in einer Quarzküvette inkubiert. Die Absolutspektren sind dargestellt. (b) Es sind die Absorptionsspektren von Menadion nach verschiedenen Inkubationsdauern in der *BLM*-Küvette abgebildet.

te verwenden. Ein ähnliches Resultat in Bezug auf die Reduktion des bc_1 -Komplexes wurde auch mit DMNH_2 erzielt und ist auch schon öfters in der Literatur beschrieben worden (Snyder and Trumpower, 1998; Covian and Trumpower, 2005). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von hydrophoben Quinolen wie Phylloquinon (Vitamin K_1), die schon während der Rekonstitution anwesend sind und ebenfalls *in situ* reduziert werden. Dieses Experiment wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch noch nicht durchgeführt.

Adsorption von Quinolen an der *BLM*-Küvette

Die *BLM*-Küvette wird aus Teflon[®] (PTFE, Polytetrafluorethylen) gefertigt. PTFE besitzt eine hohe Hydrophobizität und zeigt daher Adsorptionsverhalten gegenüber hydrophoben Substanzen, darunter auch solche biologischen Ursprungs (siehe z. B. Levesque et al., 2002; Lumsdon et al., 2005). Diese Eigenschaft ist für die Stabilität der *BLM* zwar von Vorteil, führt nun aber bei Arbeiten mit stark hydrophoben Substanzen zu Problemen bei der Kontrolle der Bedingungen in der Küvette. Bezüglich des bc_1 -Komplexes stellt sich die Frage der Verfügbarkeit seines Substrates DBH_2 in den elektrometrischen Messungen. DBH_2 besitzt in seiner reduzierten Form sehr große Verteilungskoeffizienten in einem Octanol/Wasser oder Cyclohexan/Wasser System, die jeweils über 1000 liegen (Rich and Harper, 1990). Dagegen liegen diese für Menadion ein bis zwei Größenordnungen darunter.

In Abb. 3.36 kann der Verlauf der Adsorption von DBH_2 und Menadion an der *BLM*-Küvette entnommen werden. Im Gegensatz zu Menadion, das kaum einen Konzentrationsverlust im Zeitraum von 40 min aufweist, sinkt die Konzentration von DBH_2 signifikant. Die Verteilung von DBH_2 zwischen den Proteoliposomen und der *BLM*-Küvette während einer Anlagerung an die *BLM* lässt sich leider nur schwer abschätzen. Es lässt sich zwar eine Reduktion des bc_1 -Komplexes in Proteoliposomen durch DBH_2 ausmachen, wenn die Inkubation in der *BLM*-Küvette durchgeführt wird (Daten nicht gezeigt), doch muss die Konzentration an bc_1 -Komplex und damit an Proteoliposomen in den spektroskopischen

Messungen 50fach höher liegen im Vergleich zu den elektrometrischen Messungen, um die Reduktion in den Differenzspektren erkennen zu können. Aufgrund der Adsorption an die *BLM*-Küvette bleibt festzustellen, dass die effektive Konzentration an DBH_2 schwer zu kontrollieren ist, jedoch ein wichtiger Faktor, um von einem definierten Zustand aus die elektrometrischen Reaktionen starten zu können. Hierfür böten sich einige Strategien an, die bisher noch nicht weiter untersucht worden sind:

- Wie in Abbildung 3.36 gezeigt, ließen sich kürzerkettige und damit hydrophilere Quinole verwenden. Allerdings steigert dies die Gefahr der unspezifischen Bindung an den bc_1 -Komplex, da die Aktivität mit zunehmender Seitenkettenlänge steigt und für Decylubiquinol ein Maximum aufweist (Rich and Harper, 1990). Damit einhergehend ist in der Kristallstruktur mit Stigmatellin in der Q_o -Bindungsstelle eine ausgeprägte hydrophobe Bindungstasche für die Alkylseitenkette des Stigmatellins zu sehen (Hunte et al., 2000).
- Mit Hilfe des NADH/Diaphorase-Systems ließe sich die Reduktion von einer ganzen Reihe von Quinonen und Naphthoquinonen auch *in situ* durchführen. Hierdurch lässt sich wie für Menadion gezeigt das Potential durch Verwendung verschiedener Substrate leicht verändern.
- Die langkettigen Quinole werden vor der Anlagerung an die *BLM* oder schon während der Rekonstitution beigefügt, wie es sich auch für Phylloquinon bei der QFR bewährt hat (siehe Abschnitt 3.2.2 auf S. 65). DBH_2 ist bei pH 7 nicht stabil und untergeht eine langsame Autoxidation, die durch die Anwesenheit des bc_1 -Komplex noch beschleunigt wird. Daher muss bei dieser Vorgehensweise die Reduktion der Quinole auf andere Art gewährleistet sein, entweder durch die Diaphorase oder durch geeignete Redoxmediatoren wie 2,3-Dimethoxy-1,4-benzoquinol.

Elektrometrische Messungen

Allen elektrometrischen Messungen muss vorangestellt werden, dass es sich um vorläufige Resultate handelt. Dennoch sollen die Ergebnisse hier als Diskussionsgrundlage Niederschlag finden, insbesondere um vorhandene Schwierigkeiten zu beleuchten und experimentelle Strategien aufzuzeigen.

Photoreduktion In Photoreduktionsexperimenten werden ähnlich der Oxidasemessungen beim $O \rightarrow E$ -Übergang Proteoliposomen mit bc_1 -Komplex unter aeroben und oxidierenden Bedingungen an der *BLM* angelagert. Blitzlichtanregung führt zu einem schnellen, positiven Potential über der Membran (s. Abb. 3.37(a)). Dieses entspricht einem Einwärtsstrom von Elektronen oder einem Auswärtsstrom von Protonen. Bei Kontrollmessungen mit leeren Liposomen ist dieses Signal nicht zu erkennen, statt dessen nur ein sehr schneller Artefakt ($\leq 3 \mu s$).

Das Signal nach Photoreduktion ist von der Ru_2Q -Konzentration abhängig, und dieser Prozess besitzt einen K_M -Wert von $15 \mu M$. Für das Rinderherzenzym wurde in spektroskopischen Messungen ebenfalls ein Wert von $7 \mu M$ bei geringerer Ionenstärke bestimmt (Sadoski et al., 2000). Die Kinetik der Photoreduktion lässt sich mit einer Zeitkonstante von $10 \mu s$ beschreiben (s. auch Tab. 3.5), ein Wert, der sehr gut mit dem schnellen Prozess der Reoxidation von Cytochrom c_1 übereinstimmt. Neben dieser schnellen Komponente

3. Ergebnisse

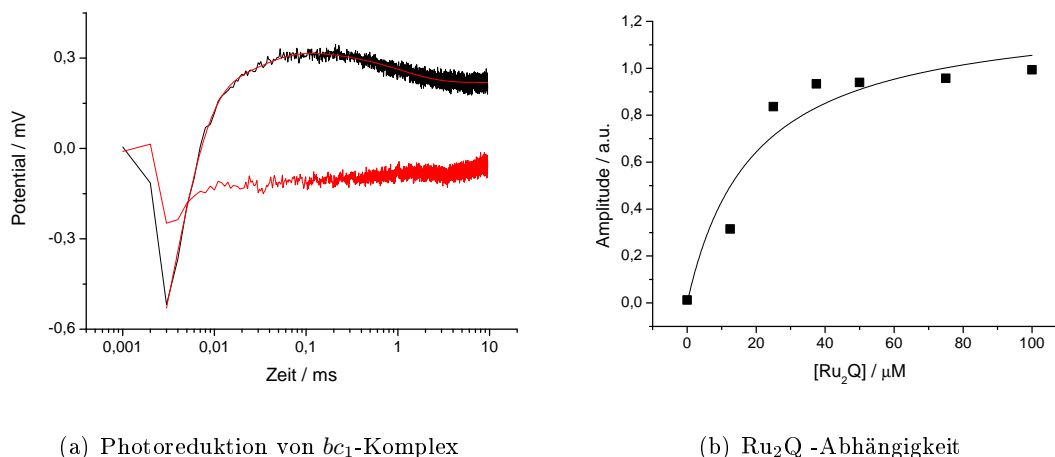


Abbildung 3.37.: Photoreduktion von oxidiertem bc_1 -Komplex: (a) Photopotentiale von Liposomen mit bc_1 -Komplex (—) und ohne (—, Kontrolle) in 50 mM HEPES, pH 7,4, 200 μM Ferricyanid als Redoxpuffer, 300 μM EDTA und 50 μM Ru_2Q . Die rote Linie im bc_1 -Signal gibt den Verlauf des Fits wider, der eine Zeitkonstante von $\tau = 12 \mu s$ für den Anstieg besitzt. (b) Abhängigkeit der Amplitude von der Ru_2Q -Konzentration.

war in einigen Experimenten auch eine langsamere Phase von 1 ms zu beobachten, die jedoch nicht reproduzierbar auftrat und eine gegenüber der schnellen Phase viel geringere Amplitude aufwies. Das Vorzeichen dieses Prozesses ist umgekehrt zum ersten und könnte einer unspezifischen Oxidation über Cytochrom c_1 durch exogene Oxidationsmittel entsprechen. Die Photoreduktion konnte in den elektrometrischen Messungen im Gegensatz zu den spektroskopischen nicht erfolgreich durch Stigmatellin inhibiert werden. Der Grund hierfür liegt jedoch wahrscheinlich in den experimentellen Schwierigkeiten der Stigmatellinbindung (s. u.). Durch Erhöhung der Ionenstärke, bzw. durch Anwesenheit von oxidiertem Cytochrom c , einem kompetitiven Inhibitor für die Ru_2Q -Bindung, lässt sich die Amplitude der Photoreduktion stark verringern. Auch wenn dies nicht notwendigerweise einen funktionellen Elektronentransfer im bc_1 -Komplex beweisen muss, deuten die vorhandenen Daten zusammen mit den in der Literatur dokumentierten spektroskopischen Messungen auf eine Elektrogenizität des Elektronentransfers von Cytochrom c_1 auf das Eisen-Schwefel-Zentrums des Rieske-Proteins hin.

Photooxidation Durch Wahl der Bedingungen wird auch der umgekehrte Prozess, die physiologische Richtung der Elektronenbewegung vom Rieske-Protein zum Cytochrom c_1 , in den BLM-Messungen als Photooxidationsexperiment zugänglich. Statt des stark oxidierenden Redoxpuffers Ferricyanid wird der bc_1 -Komplex mit DBH_2 reduziert. Weiterhin wird die Reoxidation des nach der Photooxidation reduziert vorliegenden Rutheniumkomplexes durch die Anwesenheit von Paraquat als Elektronenfänger (im Gegensatz zu EDTA in der Photoreduktion) beschleunigt, was die Gesamtreaktion der Photooxidation effizienter gestaltet.

Die Artefakte in Abwesenheit von Ru_2Q können gegenüber den Signalen vernachlässigt werden (s. Abb. 3.38). Durch Photooxidation wird eine Spannung über der Membran aufgebaut, die sich wenigstens aus zwei Phasen zusammensetzt (s. Tab. 3.5), einer schnellen

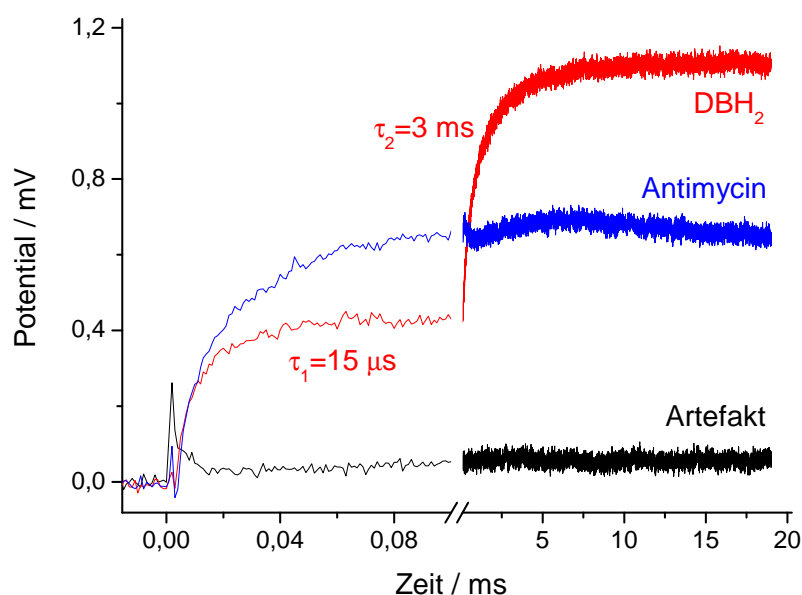


Abbildung 3.38.: Photooxidation des reduzierten bc_1 -Komplexes unter reduktiven Bedingungen: Proteoliposomen mit bc_1 -Komplex werden eine Stunde lang in 50 mM HEPES, pH 7,4, an die BLM angelagert. Darauf werden 1 mM Paraquat und 36 μ M DBH_2 hinzugefügt und fünf Minuten inkubiert. Anregung durch einen Lichtblitz bei 450 nm ruft nur einen schnellen Lichtartefakt auf der Membran hervor (—). Nach Zugabe von 25 μ M Ru_2Q wird ein positives Photopotential gemessen (—), die Zeitkonstanten für die beiden Phasen aus einem Fit sind angegeben (s.a. Tabelle 3.5). Die langsame Phase lässt sich durch 10 μ M Antimycin inhibieren (—).

Phase mit einer gleich großen Zeitkonstante wie in der Photoreduktion gesehen ($\tau_1 = 13 \mu$ s) und einer langsameren im Millisekundenbereich. Diese zweite Phase zeigt sich sensitiv gegenüber der Zugabe von Antimycin, einem Inhibitor der Q_i -Bindungsstelle.

Der Effekt der Reduktion des bc_1 -Komplexes durch DBH_2 kann leicht in den Signalen vor und nach Zugabe von DBH_2 zu angelagerten Proteoliposomen erfasst werden (s. Abb. 3.39(a)). Während in Abwesenheit von DBH_2 nur die schnelle Komponente zu erkennen ist, bildet sich die langsamere Phase durch die partielle Reduktion des bc_1 -Komplex deutlich aus, ein weiterer Hinweis neben der Antimycinsensitivität, dass es sich hierbei um ein vom bc_1 -Komplex hervorgerufenen Signal handelt. Andere Artefaktquellen können anhand weiterer Kontrollmessungen ausgeschlossen werden (Abb. 3.39(b)): Sind statt der Proteoliposomen mit bc_1 -Komplex nur leere Liposomen vorhanden, erzeugt Blitzlichtanregung nur einen schnellen Lichtartefakt auf der Membran. Bei Anwesenheit von Ru_2Q ist darüberhinaus noch eine kleine Stufe im Spannungssignal zu erkennen, das in seiner Amplitude jedoch klein im Vergleich zu den Messungen mit dem bc_1 -Komplex ist. Diese wird durch eine unspezifische elektrostatische Bindung an die Liposomen hervorgerufen und kann durch Erhöhung der Ionenstärke unterbunden werden.

In den zeitaufgelösten spektroskopischen Messungen verlief die Rereduktion von Cytochrom c_1 ebenfalls in zwei Phasen mit $\tau_1 = 16 \mu$ s und $\tau_2 = 1$ ms (s. Tab. 3.5, Sadoski et al., 2000), wobei die langsamere mit der Häm b_H -Reduktion einherging. Dabei wurde die

3. Ergebnisse

	Experiment	Schnelle Phase	Langsame Phase
Elektro- metrische Messungen	Photoreduktion	10,0 (± 2) μ s (100%)	—
	Photooxidation	13,3 (± 5) μ s (70% ± 15)	3,75 ($\pm 1,2$) ms (30% ± 15)
	+ Antimycin	26,0 (± 5) μ s (93% ± 5)	1,22 ($\pm 0,7$) ms (7% ± 5)
Spektro- skopische Messungen	Photoreduktion	11 μ s (57%)	136 μ s (43%)
	Photooxidation	16 μ s (66%)	1 ms (34%)
	+ Antimycin	17 μ s (60%)	1 ms (40%)

Tabelle 3.5.: Zusammenfassung der Zeitkonstanten aus den elektrometrischen Messungen am bc_1 -Komplex unter verschiedenen Bedingungen im Vergleich zu den spektroskopischen Daten der Cytochrom c_1 -Reoxidation, bzw. Rereduktion (Daten für *Rh. sphaeroides* aus Sadoski et al., 2000).

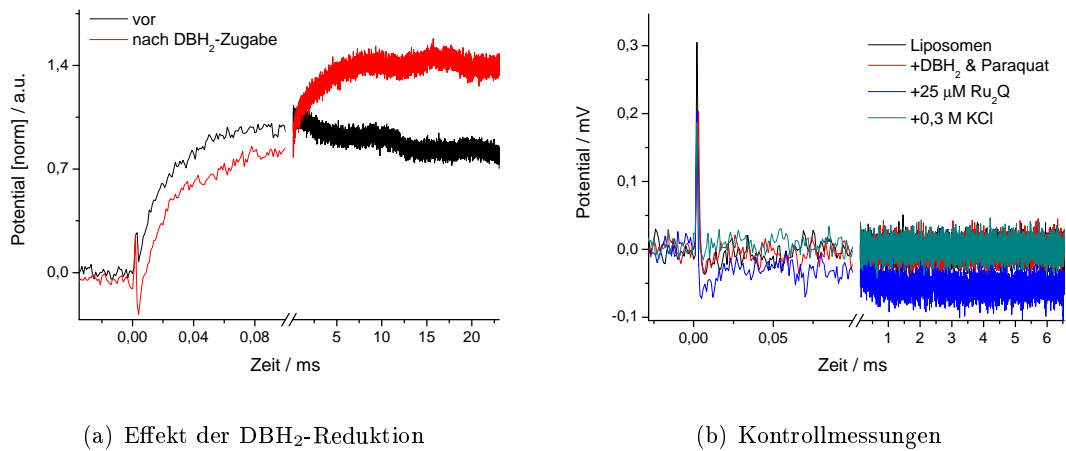


Abbildung 3.39.: (a) Elektrometrische Signale des bc_1 -Komplex in Ab- und Anwesenheit von DBH₂ (Bedingungen für Photooxidationsmessungen wie in Abb. 3.38). Die Signale sind auf die schnelle Phase genormt. (b) Kontrollmessungen an leeren Liposomen. In Abwesenheit sämtlicher Substrate ist nur ein schneller Lichtartefakt zu sehen (—). DBH₂ und Paraquat haben hierauf keinen Einfluss (—), Ru₂Q erzeugt zusätzlich ein kleine negative Stufe (—), die durch Erhöhung der Ionenstärke gequenchet werden kann (—).

schnelle Phase der Rereduktion durch das Eisen-Schwefel-Zentrum des Rieske-Proteins, das bereits reduziert vorlag, zugeordnet. Die langsamere wird durch die Quinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle hervorgerufen. In den elektrometrischen Messungen fällt die Zuordnung bisher noch schwer. Neben der Photooxidation findet sicher auch noch der Photoreduktionsprozess statt. Obwohl unter reduktiven Bedingungen gearbeitet wird und Paraquat statt EDTA eingesetzt wird, tritt ein ähnlich schneller Prozess ($\tau=10\text{ }\mu\text{s}$) auch in Abwesenheit von DBH_2 auf (s. Abb. 3.39(a)).

Aus den spektroskopischen Experimenten mit DBH_2 ist bekannt, dass der bc_1 -Komplex nicht vollständig reduziert vorliegt (S. Abb. 3.35) und gleichzeitig die Konzentration des Quinols wegen der konkurrierenden Adsorption an die *BLM*-Küvette nicht genau bekannt ist (s. Abb. 3.36).

Noch schwerwiegender für die Zuordnung der einzelnen Phasen wiegt die Tatsache, dass die spezifische Inhibition mit Stigmatellin und Antimycin nur unzureichend in der Teflonküvette stattfindet (s. Abb. 3.40). Insbesondere die Zugabe von Stigmatellin führte zu keiner Änderung in den Signalen. Das Problem bei der Zugabe von hydrophoben Substraten offenbarte sich auch bei elektrometrischen Messungen an einem Lampensetup, in dem sich die Aktivität des bc_1 -Komplexes unter Substratumsatz testen lässt. Dabei können transiente Ströme aufgrund der Aktivität des bc_1 -Komplexes an der *BLM* gemessen werden, sowie stationäre Ströme über der *BLM* bei Anwesenheit von Ionophoren. Diese ermöglichen den Ladungsrückfluss (Bamberg et al., 1979), so dass ein stationärer Strom durch fortlaufende Reduktion des bc_1 -Komplexes durch DBH_2 und Oxidation durch das angeregte Ru_2Q erreicht wird. Auch unter Verwendung von Protonophoren ist fast kein stationärer Strom zu beobachten. Die Amplitude der Signale ist ebenfalls nicht sehr hoch. Beides, stationärer Strom und Signalamplitude, ist bei der Cytochrom *c* Oxidase im Vergleich viel ausgeprägter. Grund hierfür ist wie erwähnt die schlechte Zugänglichkeit der Substrate zu den adsorbierten Proteoliposomen. Diesem Problem kommt eine zentrale Bedeutung für die Interpretation und Zuordnung der Signale zu. Dennoch lassen sich für die elektrometrischen Messungen am bc_1 -Komplex zusammenfassen:

- Photoreduktion des bc_1 -Komplexes durch Ru_2Q führt zu einem $10\text{ }\mu\text{s}$ schnellen Prozess, der durch die Reduktion des Eisen-Schwefel-Zentrums durch Cytochrom c_1 ausgelöst wird.
- Die Photooxidation von bc_1 -Komplex ist überlagert von der Photoreduktion. In beiden Fällen ist die gleiche schnelle Phase zu beobachten. Ob es sich hierbei um denselben Prozess handelt oder ob in der Photooxidation ebenfalls ein weiterer Prozess mit einer ähnlichen Zeitkonstante vorhanden ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht unterschieden werden.

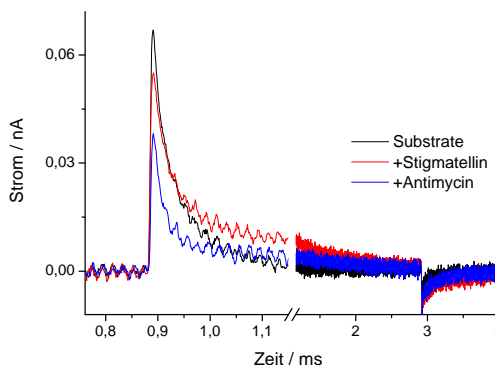


Abbildung 3.40.: Photooxidationsexperiment mit bc_1 -Komplex am Lampensetup. Unter reduktiven Bedingungen (s. Abb. 3.38) ohne Protonophoren wurde für 2 s mit einer 75 W Xenonlampe in Abwesenheit (—) und Anwesenheit von Inhibitoren (— und —) belichtet.

3. Ergebnisse

- DBH₂-Reduktion führt zur Ausbildung einer Millisekundenphase, die durch Antimycin inhibiert werden kann. Das Vorzeichen der Amplitude dieses Prozesses (Auswärtsstrom positiver Ladungen) sowie der Befund der Inhibition lässt die Folgerung zu, dass es sich um Protonenbewegung, bzw. Protonen gekoppelter Elektronentransfer aufgrund von Quinoloxidation in der Q_o-Bindungsstelle oder von Quinonreduktion in der Q_i-Bindungsstelle handelt.

4. Diskussion

4.1. Die Cytochrom *c* Oxidase

4.1.1. Die Protonenaufnahme beim O→E-Übergang

Die Protonenaufnahme beim O→E-Übergang ist Gegenstand einer Kontroverse (Ruitenberget al., 2000; Verkhovsky et al., 2001a), ob die Häm *a*-Reduktion ein Bohr-Proton nach sich zieht. Ruitenberget al. (2000) fanden nach Reduktion von Häm *a* eine Protonenaufnahme durch den K-Kanal beim O→E-Übergang. Diese Interpretation wurde unterstützt durch Messungen an der K-Kanalmutante K354M, die eine stark eingeschränkte Protonenaufnahme aufweist, und einem beobachteten kinetischen Isotopeneffekt bei Messungen in D₂O. Verkhovsky et al. (2001a) hingegen beobachteten nur eine Elektronenaufnahme, die übereinstimmend mit Ruitenberget al. (2000) mit einer Zeitkonstante von ~15 µs stattfand. Die langsamere Protonenphase war hingegen in der gemessenen Spannungsantwort nicht sichtbar. Als Erklärung führten die Autoren an, dass Ruitenberget al. (2000) Messungen an teilweise reduzierter Cytochrom *c* Oxidase durchführten, was durch die gewählten Versuchsbedingungen hervorgerufen wurde: Die für die anaerobe Umgebung zugefügte Glukose und Glukose-Oxidase stellten eine Elektronenquelle für die Cytochrom *c* Oxidase mit Ferricyanid als Mediator dar. Die beobachtete Protonenphase sei also Resultat einer zweiten Elektronenaufnahme. Erst das mit zwei Elektronen reduzierte Enzym führt zur Äquilibration der Elektronen zwischen Häm *a* und dem binuklearen Zentrum, d.h. es wäre nicht die Reduktion von Häm *a*, das mit einer Protonenaufnahme einhergehe, sondern erst der Transfer zum binuklearen Zentrum. Die Frage nach der Kopplung von Protonenaufnahme und Häm *a*-Reduktion besitzt einen wichtigen Hintergrund: Er gibt Einblick in ein wesentliches mechanistisches Detail der Arbeitsweise der COX im Zusammenhang der elektrostatischen Kompensation des Ladungstransfers.

Während in den elektrometrischen Messungen zwei kinetische Phasen identifiziert wurden, zeigen alle spektroskopischen Messungen nur eine, die mit der Reduktion von Häm *a* und der gleichen Zeitkonstante wie für den schnellen Prozess der elektrometrischen Messungen einhergeht (Kobayashi et al., 1989; Farver et al., 2000, 2006b; Nilsson, 1992). Eine Reduktion von Häm *a*₃ lässt sich mit den spektroskopischen Messungen im beobachteten Zeitbereich ausschließen, obwohl auch die Möglichkeit einer schnellen Äquilibration zwischen Häm *a* und Cu_B besteht. Dies führte ebenfalls nicht zu einer zusätzlichen Phase in der Kinetik der Häm *a*-Reduktion (Ruitenberget al., 2000).

In dieser Arbeit sollte aufgrund der angeführten Kontroverse der O→E-Übergang nochmals näher untersucht werden, um mögliche Faktoren und ihre Beeinflussung auf die Kinetik der Ladungsverschiebung zu identifizieren. Die verschiedenen Faktoren sollen hier diskutiert werden und die hier gefundenen Ergebnisse im Rahmen eines kinetischen Modells analysiert werden. Die nächsten Seiten werden folgende Fragen aufgreifen:

- Haben die Bedingungen für die elektrometrischen Messungen Einfluss auf den Redox-Zustand der COX und ist die Protonenaufnahme somit von einer teilreduzierten

Population verursacht?

- Lassen sich aufgrund der vorhandenen Ergebnisse Rückschlüsse auf eventuelle Heterogenitäten im Ausgangszustand der COX ziehen?
- Wie sind die spektroskopischen Messungen mit den elektrometrischen für den O→E-Übergang in Einklang zu bringen und welche Schlüsse lassen sich aus zwei kinetischen Modellen ziehen?

Redox-Zustand und Heterogenitäten im Ausgangszustand

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der experimentellen Bedingungen auf den Redox-Zustand der Oxidase im O→E-Übergang mit spektroskopischen Mitteln überprüft (s. Abb. 3.1 auf S.34). Dabei konnte keine Reduktion der Hämgruppen festgestellt werden. Die beobachtete Protonenphase im O→E-Übergang erwies sich als robust gegenüber den gewählten experimentellen Bedingungen. So war sie auch in Abwesenheit des Sauerstoff verbrauchenden Enzymsystems und unter aeroben Bedingungen voll ausgeprägt.

Tatsächlich fanden sich Schwankungen sowohl in der Zeitkonstante als auch in der Amplitude für den Protonentransfer durch den K-Kanal (s. Abschnitt 3.1.5 auf S. 48). Einen eindeutigen Effekt auf das Ausmaß der Protonenaufnahme besaß die Inkubation bei niedrigem pH, was im nächsten Abschnitt diskutiert werden soll. Davon abgesehen sollte untersucht werden, inwieweit Heterogenitäten auch im Enzym aus *Paracoccus denitrificans* auftreten und ob sich die Klassifizierung für das Rinderherzenzym, die sich aus der Cyanidbindungsgeschwindigkeit ergibt, auch auf die bakterielle COX übertragen lässt.

Die Inkubation bei niedrigem pH mit und ohne Chlorid führte hierbei zu keiner signifikanten Änderung in der Geschwindigkeit der Cyanidbindung (s. Abb. 3.11(a)). Die Amplitude der durch Cyanid induzierten Veränderungen war hingegen betroffen. Sie nahm nach einer Inkubation um maximal 10% ab, wobei ein pH-Wert von 6,5 in Abwesenheit von Chlorid den stärksten Effekt zeigte. Eine zweite Phase, die im selben Maße in ihrer Amplitude zunahm, wurde hingegen nicht beobachtet. Für das Rinderherzenzym wurde eine 100fach kleinere Ratenkonstante ($0,02 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) der Cyanidbindung für die langsame Form berichtet (Moody, 1996). Bei den hier durchgeführten Messungen hätte bei einem ähnlichen Verhalten der COX aus *Paracoccus denitrificans* diese Form in der Cyanidbindungskinetik entdeckt werden müssen. Aufgrund der Abwesenheit einer zweiten Phase ist die Betrachtung der Cyanidbindung keine geeignete Methode, Heterogenitäten der Enzympräparation zu charakterisieren.

Gleichwohl sind auch in der Cyanidbindung Unterschiede zwischen den Ansätzen für die pH- und Chloridinkubation deutlich geworden. In den Differenzspektren der Cyanidbindung (nach *minus* vor) wurde eine zweite Form anhand ihrer spektralen Eigenschaften beobachtet (s. Abb. 3.11(b) auf S.50). Diese zeigte einen Verlauf, der auf eine Reduktion von Häm *a* hindeutete (s. Abb. 4.1). Bei einem Standardpotential von $E'_0(\text{CN}^-|\text{OCN}^-) = -0,14 \text{ mV}$ für die Oxidation von Cyanid zu Cyanat bei pH 7 ist die Reaktion mit dem oxidierten binuklearen Zentrum oder Häm *a* thermodynamisch möglich. Diese Reaktion wird allerdings aufgrund der starken Bindung von Cyanid an das oxidierte Häm *a*₃ nicht beobachtet. So könnte es sich auch um das Differenzspektrum einer zweiten Form mit Cyanid gebunden handeln, bei der Häm *a* weiterhin oxidiert vorliegt. Eine ähnliche Form findet sich nämlich auch bei der Relaxation des gepulsten Enzyms in die

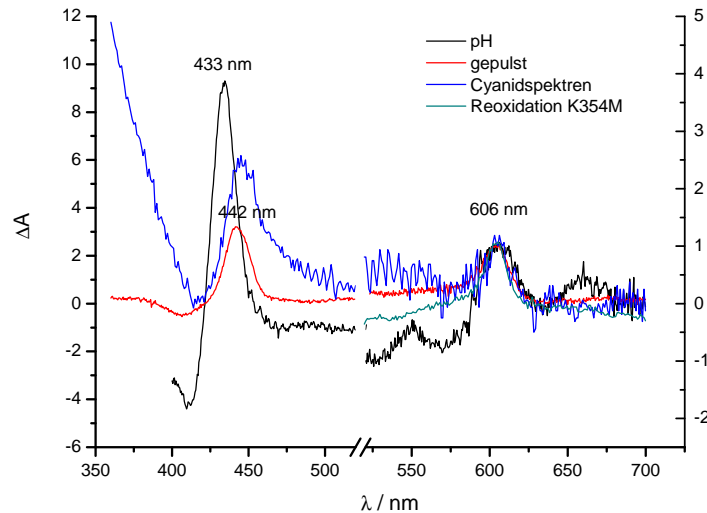


Abbildung 4.1.: Vergleich von verschiedenen Differenzspektren, die auf Heterogenitäten der COX aus *Paracoccus denitrificans* hindeuten: Dargestellt ist das Spektrum, das durch Verschiebung des pH-Wertes (pH 7,4 *minus* pH 6,5, Abb. 3.4(a) auf S.37) induziert wird (—), die Relaxation der gepulsten Form (5 min *minus* 90 min nach Pulsen —, Abb. 3.12(b) auf S.51), das Doppel-differenzspektrum der Differenzspektren nach Cyanidbindung der Proben nach 4 h *minus* 5 min Inkubation bei pH 7,4 (Abb. 3.11(b) auf S.50, —). Als Vergleich ist die durch Ferricyanid induzierte Reoxidation von K354M dargestellt, die hauptsächlich auf die Reoxidation von Häm *a* zurückzuführen ist (Konstantinov et al., 1997). Zur besseren Vergleichbarkeit sind alle Spektren auf die Differenz $\Delta A_{606-632\text{ nm}}$ normiert.

ursprüngliche oxidierte Form (s. Abb. 4.1). Sie ist jedoch unterschiedlich zu den spektralen Änderungen, die durch einen pH-Sprung herbeigeführt werden.

Die Differenzspektren sind in ihrer Aussage nicht eindeutig. Dennoch lassen sich bei genauerer Betrachtung einige Schlüsse bezüglich der Heterogenitäten in der Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* ziehen. So sind die spektralen Änderungen in der α -Bande in den hier beobachteten Differenzspektren der Häm *a*-Reduktion sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch im Bereich der Soretbande voneinander und von den spektralen Charakteristika, die für Häm *a* berichtet wurden (v.a. ein Minimum bei 425 nm; s. Hellwig et al., 1999a). Das legt verschiedene Formen der COX in den verschiedenen Enzympräparationen nahe. Allerdings konnte nicht festgestellt werden, worin sich die einzelnen Spezies unterscheiden, in welcher Menge sie anwesend sind und wodurch sie herbeigeführt werden. Die für die Rinderherzoxidase gültigen Parameter zur Unterscheidung wie Cyanidbindungsrate konnten für die bakterielle Oxidase nicht herangezogen werden.

Zusammenfassung über die Variabilität: Die eindeutige Charakterisierung der isolierten COX bleibt eine Herausforderung. Alle Methoden, Heterogenitäten quantitativ zu verfolgen oder das Enzym in einen definierten oxidierten Zustand zu bringen, besitzen ihre Nachteile:

- Die Cyanidbindungskinetiken sind aufgrund von spektralen Überlappungen schwierig zu interpretieren. Bei langen Beobachtungs- oder Inkubationsphasen stellen sich neben der Cyanidbindung auch andere Prozesse ein, die das quantitative Auswerten

nicht ermöglichen. Aufgrund der unterschiedlichen Differenzspektren lässt sich jedoch die Präsenz von wenigstens zwei verschiedenen Formen detektieren.

- Pulsen von COX hat an der Reaktivität des Enzyms nichts zum Positiven verändert. Im Gegenteil: Viele Proben neigten nach Reoxidation zur Instabilität, die sich auch spektroskopisch verfolgen ließ. Diese neue Form zeigte eine geringere Reaktivität gegenüber exogenen Reduktionsmitteln wie H_2O_2 oder CO. Nachteilig ist weiterhin das unkontrollierte Einführen von Reduktionsmitteln, die nach Reoxidation zu einem Gemisch partiell reduzierter Spezies an COX führen können.
- Das Chlorid freie Enzym zeigt keine Besonderheiten gegenüber der klassisch aufgereinigten Variante in den elektrometrischen Messungen und der Cyanidbindungskinetik. Allerdings war ein Effekt auf die Ausbildung des F-Zustandes zu beobachten (s. Abschnitt 3.1.4 auf S.46). Eine Chloridbindungsstelle ist daher wahrscheinlich, wie auch schon vielfach in der Literatur (s. z.B. Fabian et al., 2001, 2004; Moody et al., 1998) beschrieben worden ist. Nimmt man die Ausbeute des F-Zustandes als Indikator für die chloridgebundene Form, stellt man jedoch auch fest, dass selbst die Enzympräparationen, die in Gegenwart von Chlorid aufgereinigt wurden, kein Chlorid gebunden haben, da nur nach Chloridinkubation eine geringere Ausbeute an F-Zustand feststellbar war.
- Die FT-IR Differenzspektren der CO Photolyse am reduzierten Enzym decken intrinsische Heterogenitäten im binuklearen Zentrum auf (s. Abb. 3.13 auf S.52). Die Interpretation dieser Daten ist aufgrund fehlender Korrelationen jedoch schwierig: Es ist nicht bekannt, welche Faktoren zu verschiedenen Populationsverhältnissen bei den einzelnen Konformeren führen. Aufgrund der Methodik eignet sich diese Methode auch nicht für eine schnelle Charakterisierung.

pH-Abhängigkeit

In der Literatur ist über verschiedene Phänomene nach Änderung des pH-Wertes berichtet worden. So sind in der reduzierten CO bindenden Spezies verschiedene Konformere beobachtet worden (s. Abschnitt 3.1.5 auf S. 52), die mit einem apparenten pK_s -Wert von 7,3 ineinander übergehen (Mitchell et al., 1996b; Rost et al., 1999; Wang et al., 1995). Weitere pH-abhängige Übergänge von Konformeren sind auch mit Resonanz-Ramanspektroskopie beobachtet worden (Das et al., 2001). Panda and Robinson (1995) interpretierten die pH-Abhängigkeit der Cyanidbindungskinetik mit zwei sequentiellen Reaktionsschritten. Der erste wird hierbei durch eine pH-abhängige Konformation vermittelt, die HCN binden kann und ebenfalls einen apparenten pK_s -Wert von 7-7,5 besitzt. Dies ist in Übereinstimmung mit spektralen Änderungen im sichtbaren Bereich, die durch verschiedene pH-Werte ausgelöst werden (Fabian and Malmström, 1989; Holm et al., 1995). Auch hier wurde eine protonierte und deprotonierte Form der oxidierten COX angenommen mit einem pK_s -Wert von 7,8 (Papadopoulos et al., 1991; Brooks et al., 1997). Und ebenso tritt bei der Dithionit-reduktion eine Form bei niedrigem pH-Wert auf, deren binukleares Zentrum nur langsam in einer zweiten Phase reduziert wird (Cooper et al., 1993). Auch hier wurde ein apparenter pK_s -Wert von 7,8 gefunden. Aus all den verschiedenen Messungen lässt sich schließen, dass die COX in verschiedenen Protonierungszuständen vorkommen kann.

Bei der Untersuchung des O→E-Überganges wurden in dieser Arbeit auch die Änderungen der Spannungssignale nach einem pH-Sprung verfolgt. Dabei wurde ein starker Effekt auf die Amplitude der Protonenphase beobachtet, die über der Zeit nach dem pH-Sprung verschwand (Abb. 3.3 auf S.36). In spektroskopischen Messungen ging dies mit einer Verschiebung der Soretbande zu kürzeren Wellenlängen einher (Abb. 3.4 auf S.37). Beide Prozesse verliefen für die COX in Proteoliposomen sehr langsam mit Zeitkonstanten von 140 min (elektrometrisch) und 40 min (spektroskopisch); sie stimmen hierin aber mit der Kinetik überein, die für die gleichen Änderungen der Soretbande im Rinderherzenzym beobachtet wurde (55 min, Papadopoulos et al., 1991). Das Verschwinden der zweiten Phase in den elektrometrischen Messungen kann mehrere Ursachen besitzen:

- Die Protonierungsstelle innerhalb der COX, die für die beobachtete langsame Phase in den elektrischen Experimenten beim O→E-Übergang verantwortlich ist, ist über die Protonenwege zugänglich, nachdem der pH-Wert des Vesikelinneren mit der Außenphase äquilibrierte. Durch Besetzung der Stelle vor der Elektronenaufnahme kann das kompensierende Proton nicht mehr aufgenommen werden.
- Die Protonenaufnahme erfolgt mit derselben Geschwindigkeit wie die Elektronenaufnahme. Dadurch ließen sich die beiden Phasen in ihrem Verlauf nicht mehr diskriminieren: Die Protonentransferrate wäre vom Protonierungszustand einer oder mehrerer Gruppen abhängig.
- Die Cytochrom *c* Oxidase wird bei niedrigem pH in die langsame Form bzw. in einen anderen Protonierungszustand überführt, der durch eine langsame Protonierungsreaktion des Enzyms ausgelöst wird. Dieser Prozess folgt dem beobachteten Zeitverlauf. Dadurch ist die Protonierungsstelle für den O→E-Übergang schon besetzt und die Protonenphase nicht mehr in den elektrometrischen Messungen anwesend.

Die Angleichung des pH-Wertes zwischen dem Inneren der Vesikel und dem Außenmedium lässt sich abschätzen. Die Permeabilität von Protonen ist im Vergleich zu anderen kleinen geladenen Ionen sehr hoch (Paula et al., 1996; Deamer and Nichols, 1983), was zu verschiedenen Theorien über den Transportmechanismus von Protonen durch Lipidmembranen führte (DeCoursey, 2003; Tepper and Voth, 2005; Haines, 2001; Lawaczeck, 1988). Für Proteoliposomen, die die Cytochrom *c* Oxidase enthalten, wurde eine Protonenpermeabilität von $P_H = 6,1 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt (Wigglesworth et al., 1990). Die Zeit zum Ausgleich der pH-Differenz zwischen dem Vesikelinneren und der Außenphase lässt sich abschätzen (Grzesiek and Dencher, 1986):

$$\Delta pH(t) = \Delta pH_{t=0} \cdot e^{t/-(\tau)} \quad (4.1)$$

$$\langle \tau \rangle = \left\langle \frac{VB}{A} \right\rangle \frac{1}{P_H c_H^a \ln 10} \quad (4.2)$$

$$B = \ln 10 (c_H + c_{OH} + \frac{c_{Hepes} K_S c_H}{(K_S + c_H)^2}) \quad (4.3)$$

wobei V und A das Vesikelvolumen und die Fläche der als Kugel angenommenen Vesikel mit einem Radius von 150 nm (elektronenmikroskopische Aufnahmen) darstellen, c_H^a die Protonenkonzentration in der Außenphase (6,5) und B die Pufferkapazität. Diese kann mit

dem bekannten pK_s -Wert für Hepes (7,5) berechnet werden. Für die Zeitkonstante $\langle\tau\rangle$ erhält man so 390 s, d.h. die pH-Werte der Außenphase und des Vesikelinneren sollten sich nach Anlagerung der Liposomen an die *BLM*, die etwa 60 min benötigt, angeglichen haben. Auch wenn diese Annäherung viele Faktoren vernachlässigt, die zu einer langsameren Äquilibration führten (z. B. Diffusionspotentiale, siehe auch Deamer and Nichols, 1983).

Die zweite und die dritte Möglichkeit für eine Erklärung des pH-Effektes sind schwierig voneinander zu trennen. Schließt man die Anwesenheit einer langsamen Form aus, die sich wie gezeigt nicht manifestierte, so erscheint die COX entweder in einem anderen Protonierungszustand mit einer protonierten Akzeptorstelle oder in einer anderen pH-abhängigen Konformation mit gleich schnellem Elektronen- und Protonentransfer.

Ein unterschiedlicher Protonierungsgrad wirft die Frage der Ladungskompensation auf, denn die An- bzw. Abwesenheit einer positiven Ladung sollte innerhalb des Proteins ausgeglichen sein. Doch Proteine können die positive Desolvationsenergie von geladenen Aminosäureresten im hydrophoben Inneren mit verschiedenen Mitteln ausgleichen, so dass insgesamt unterschiedliche Ladungszustände möglich sind (Kim et al., 2005) und in diesem Fall die COX auf Änderungen des pH-Wertes im Außenmedium durch Übergang in einen anderen Protonierungszustand anspricht. Dennoch besteht weiterhin die Notwendigkeit, dieselbe Anzahl an Ladungen in einem katalytischen Zyklus unabhängig vom Ausgangszustand umzusetzen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass die Anzahl der abgegebenen Protonen bei Oxidation der Metallzentren durch Sauerstoff und anschließender Rereduktion, die Redox-Bohr-Protonen, sich abhängig vom aktuellen pH-Wert auf die reduktive und auf die oxidative Phase verteilen (Capitanio et al., 2000b, 2003), d.h. die Oxidase verlagert die Aufnahme eines Protons je nach pH-Wert in verschiedene Schritte des Zyklus.

Auch hierfür finden sich Evidenzen in der Literatur. Einarsdóttir et al. (2002) fanden spektrale Unterschiede zwischen der P_R -Form aus der Reaktion der reduzierten COX mit Sauerstoff und der P_M -Form aus der gleichen Reaktion ausgehend vom MVCO-Zustand, die sie mit einer komplexeren Zusammensetzung der P_R -Form erklärten. Ausgehend von diesem Befund wurde ein Modell aus den kinetischen optischen Differenzspektren entwickelt. Die Intermediate folgen nicht sequentiell aufeinander, sondern die Reaktion des reduzierten Enzyms mit Sauerstoff verläuft auf zwei sich aufspaltenden Reaktionswegen, deren Population durch die COX vom pH-Wert bestimmt wird (Van Eps et al., 2003; Szundi et al., 2003, 2004).

Zusammenfassung pH-Abhängigkeit: Die elektrometrischen und spektroskopischen Daten zeigen einen pH-Effekt auf die Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*. Die erhöhte Protonenkonzentration führt zu einer veränderten Kinetik in den Spannungssignalen, bei denen nach längerer Inkubation keine Protonenphase mehr zu beobachten ist. Die Verschiebung der Soretbande in den spektroskopischen Messungen bei Übergang zu niedrigem pH wurde mit der Anwesenheit einer positiven Ladung in der Nähe des binuklearen Zentrums erklärt (Papadopoulos et al., 1991). Zusammen mit den Literaturdaten werden hier verschiedene Protonierungszustände der COX favorisiert, auch wenn eine langsame pH-abhängige Konversion in eine andere Konformation nicht auszuschließen ist.

Modell des O→E-Überganges

Die elektrometrischen Daten sollen hier im Rahmen eines einfachen Modells beschrieben werden und im Zusammenhang mit den beobachteten spektroskopischen Messungen diskutiert werden. Während aus den elektrometrischen Experimenten zwei Relaxationszeiten

erhalten werden, die zum einen dem Elektronentransfer von Cu_A nach Häm a und zum anderen dem Protonentransfer über den K-Kanal zugeordnet werden (vgl. Abb. 3.5(a) auf S.39, Ruitenbergh et al., 2000), findet sich in den spektroskopischen für die Cu_A -Oxidation und die Häm a -Reduktion nur eine gemeinsame Relaxationszeit, die mit der schnellen Relaxationszeit aus den elektrometrischen Messungen übereinstimmt. Allgemein lässt sich die Fragestellung mit zwei reversiblen Reaktionen definieren, die den Elektronen- und Protonentransfer beschreiben:



O stellt hierbei die COX nach Photoreduktion von Cu_A durch Rubpy dar, danach erfolgt die Äquilibrierung des Elektrons (E) mit anschließender Protonenaufnahme über den K-Kanal (EH). Die Differentialgleichungen der beiden reversiblen Reaktionen lassen sich analytisch lösen:

$$\begin{pmatrix} -k_{12} & k_{21} & 0 \\ k_{12} & -(k_{21} + k_{23}) & k_{32} \\ 0 & k_{23} & -k_{32} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_O \\ c_E \\ c_{EH} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \lambda c_O \\ \lambda c_E \\ \lambda c_{EH} \end{pmatrix} \quad (4.5)$$

Nach Bestimmung der Eigenwerte λ_i , die den inversen Zeitkonstanten aus den Experimenten entsprechen, und der dazugehörigen Eigenvektoren werden diese entsprechend den Anfangs- und Endbedingungen normiert, d.h. $c_O(0) = 1$, $c_E(0)$, $c_{EH}(0) = 0$ und $(c_E(\infty) + c_{EH}(\infty))/c_O(\infty) = 2$ aus der Gleichgewichtsbedingung (s. Tab. 3.1.2 auf S.42). Schließlich erhält man die analytische Form der zeitabhängigen Konzentrationen der einzelnen Zustände sowie der beiden beobachteten Prozesse, beschrieben durch die Ratenkonstanten des obigen Modells.

$$\begin{aligned} c_O(t) &= A_0 + A_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + A_2 \cdot e^{\lambda_2 t} \\ c_E(t) &= B_0 + B_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + B_2 \cdot e^{\lambda_2 t} \\ c_{EH}(t) &= C_0 + C_1 \cdot e^{\lambda_1 t} + C_2 \cdot e^{\lambda_2 t} \end{aligned} \quad (4.6)$$

Aus den Populationen der drei Zustände lassen sich für die jeweiligen Werte k_{ij} die Spannungssignale berechnen:

$$\begin{aligned} U(t) &= d \cdot (c_O(0) - c_O(t)) + (1 - d) \cdot (c_{EH}(t) - c_{EH}(0)) \\ A_{H^+} &= (1 - d) \cdot \frac{c_{EH}(\infty)}{c_O(\infty) + c_E(\infty) + c_{EH}(\infty)} \\ A_{e^-} &= d \cdot \frac{c_E(\infty) + c_{EH}(\infty)}{c_O(\infty) + c_E(\infty) + c_{EH}(\infty)} \end{aligned} \quad (4.7)$$

Der Parameter d steht für die *rdla* (*relative dielectric location of heme a*), die das Ausmaß der Ladungsverschiebung bei Elektronentransfer von der P-Seite nach Häm a beschreibt. Dementsprechend wird der Protonentransfer von der P-Seite nach Häm a mit $(1 - d)$ skaliert. A_{H^+} und A_{e^-} beschreiben die relativen Amplituden des Protonen- und Elektronentransfers in den Spannungssignalen.

4. Diskussion

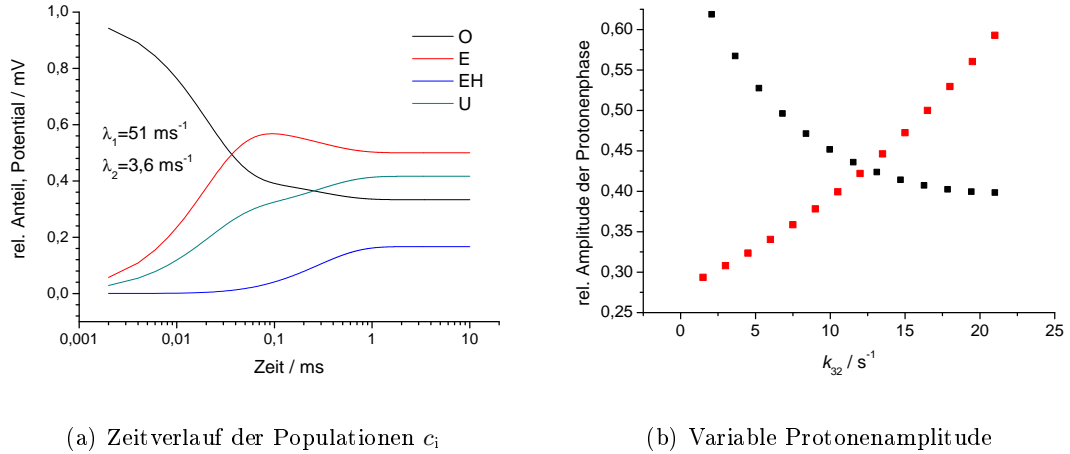


Abbildung 4.2.: (a) Die Populationen sind mit den Gleichungen aus Gl.4.6 unter Verwendung von $k_{12} = 30 \text{ ms}^{-1}$, $k_{21} = 20 \text{ ms}^{-1}$, $k_{23} = 1 \text{ ms}^{-1}$, und $k_{32} = 3 \text{ ms}^{-1}$ berechnet worden. Deutlich sind die beiden beobachteten Phasen mit Relaxationszeiten von $\tau_1 = 1/\lambda_1 = 19 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 1/\lambda_2 = 280 \mu\text{s}$ und relativen Amplituden von 70% und 30% für die Elektronen- bzw. Protonenphase zu sehen. (b) Einfluss der Ratenkonstanten der Protonenphase auf die relative Amplitude der Protonenphase A_{H^+} . Für die Elektronenphase wurden dieselben Werte wie in (a) verwendet; für die Protonenphase wurde k_{32} einmal variiert und $k_{23} = 1$ konstant gehalten (schwarze Punkte) und einmal berechnet unter der Bedingung eines konstanten Gleichgewichtes ($\frac{c_E(\infty) + c_{EH}(\infty)}{c_O(\infty)} = 2$, rote Punkte).

Die zeitabhängigen Konzentrationen der drei Zustände lassen sich nun durch Einfügen konkreter Werte berechnen und mit den beobachteten Signalen vergleichen; ein Beispiel ist in Abb.4.2(a) zu sehen. Der Einfluss der Ratenkonstanten auf die relativen Amplituden wird in Abb.4.2(b) gezeigt: Durch Variation einer Ratenkonstante wird, auch unter Beibehaltung der Gleichgewichtsbedingungen, die relative Amplitude der Protonenphase verändert. Daher kann eine sich ändernde Amplitude, wie sie in den pH-Messungen und als Variabilität unter identischen Bedingungen beobachtet wird (s. Abb. 3.10 auf S.49), auch einen kinetischen Ursprung besitzen, der nicht notwendigerweise auf die Anwesenheit zweier unterschiedlich protonierter Zustände zurückzuführen sein muss, sondern von Populationen herrührt, die unterschiedliche Ratenkonstanten besitzen.

Während das Verhalten des Spannungssignals sehr gut mit den experimentellen Kurven übereinstimmt, wird im Verlauf von c_O in Abb. 4.2(a) deutlich der Einfluss der zweiten Reaktion sichtbar: Dies stimmt mit den Beobachtungen der spektroskopischen Messungen nicht überein, in denen die Einstellung des Elektronengleichgewichts in einer Phase mit einer Zeitkonstante von $\tau = 20 \mu\text{s}$ verläuft. Tatsächlich lassen sich für das Modell zweier reversibler Reaktionen keine Werte der einzelnen Ratenkonstanten finden, die die Äquilibration zwischen Cu_A und Häm a berücksichtigen (Gleichgewicht) und gleichzeitig eine Variabilität in der Protonenphase aufweisen. Dieser Sachverhalt wird schnell deutlich, wenn man die erste Reaktion als eine schnelle vorgelagerte Gleichgewichtsreaktion fasst. Durch Fortlauf der zweiten Reaktion ($E \rightleftharpoons EH$) folgt das erste Gleichgewicht, was sich in einer Abnahme von $c_O(t)$ mit der zweiten Zeitkonstante niederschlägt. Eine weitere Abnahme von $c_O(t)$ würde in den spektroskopischen Messungen durch eine Oxidation

von Cu_A bei 825 nm und durch eine Reduktion von Häm *a* bei 605 nm sichtbar werden: Die Signale folgten dem Zeitverlauf der Protonenaufnahme. Ein Modell mit zwei reversiblen Reaktionen beschreibt also das Verhalten der einzelnen Phasen in Hinblick auf die spektroskopischen und elektrometrischen Messungen nicht ausreichend. Wie lassen sich die verschiedenen Messungen miteinander vereinbaren?

1. Eine thermodynamische Kopplung zwischen Häm *a*-Reduktion und Protonenaufnahme ist mit den kinetischen Messungen nicht vereinbar, da die Protonierungsreaktion auch in den spektroskopischen Messungen sichtbar sein müsste. Andererseits weist das Mittelpunktpotential von Häm *a* eine pH-Abhängigkeit auf, auch wenn diese mit verschiedenen Werten beschrieben und durch unterschiedliche Modelle erklärt wurde (Capitanio et al., 2000a; Verkhovsky et al., 1999a). Ebenso unterstützen elektrostatische Messungen eine Kompensation des Elektronentransfers durch Aufnahme eines Protons (Kannt et al., 1998a).
2. Wären die elektronischen Spektren der Intermediate *EH* und *O* im Bereich um 820 nm identisch, könnte eine zweite Phase, die mit der Protonierung einhergeht, ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Reduktion von Häm *a* wäre jedoch nun thermodynamisch an die Aufnahme eines Protons gebunden. Das Spektrum im nahinfraroten Bereich (≥ 800 nm) wird zwar von der Cu_A-Absorption dominiert, doch auch die Hämgruppen besitzen hier in Abhängigkeit von Liganden und Redox-Zustand eine geringe Absorption (Eglinton et al., 1980, 1984; Hendler et al., 1994; Szundi et al., 2001). Dadurch und durch die geringen Absorptionsänderungen in diesem Spektralbereich könnte eine zweite Phase in der Cu_A-Oxidation im O→E-Übergang maskiert werden.
3. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass Unterschiede zwischen der COX im solubilisierten Zustand (spektroskopische Messungen) und in Proteoliposomen (elektrometrische Messungen) bestehen. So führten veränderte Mittelpunktspotentiale zu Gunsten einer Häm *a*-Reduktion ebenfalls zu einer thermodynamischen Kopplung. Die zweite Phase der Cu_A-Oxidation fiel ungleich geringer aus und wäre schwierig zu detektieren. Es waren sowohl in den elektrometrischen Messungen an der *aa*₃- als auch der *ba*₃-Oxidase Unterschiede in den gemessenen Relaxationszeiten für den Elektronentransfer gemessen worden (vgl. Tabelle 3.1.2 auf S.42). Diese beschrieben jeweils einen schnelleren Prozess als in den spektroskopischen Messungen.
4. In der Literatur finden sich für die Potentialdifferenz zwischen Cu_A und Häm *a* eine Reihe von Werten, die größer als die Werte aus den Puls-Radiolyse Experimenten von Farver et al. (2006b) sind. Aus potentiometrischen Titrations wurde für das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* eine Differenz von $\Delta E = 100$ mV ($K = 50$) gemessen (Gorbikova et al., 2006). Aus dem Elektronenrückfluss von Häm *a* auf Cu_A nach CO-Photolyse ausgehend vom MVCO-Zustand fand sich für das Enzym aus *Rhodobacter sphaeroides* eine Gleichgewichtskonstante von 9 (Ädelroth et al., 1995) und bei Anwesenheit eines zusätzlichen Elektrons ein Wert von ~ 2 (Morgan et al., 1989). Bei Photoreduktion durch einen an Cytochrom *c* gekoppelten Rutheniumkomplex wurde eine Differenz von $\Delta E = 50$ mV ($K = 6$) gemessen (Wang et al., 2002), in anderen vergleichbaren Messungen war die Gleichgewicht noch weiter zu Gunsten von Häm *a* (Abb. 4 in Nilsson, 1992; Pan et al., 1993; Kobayashi et al., 1989). Es besteht noch

Unsicherheit über die Größe von K für die Elektronenverteilung zwischen Häm a und Cu_A . Je größer K , desto einfacher ist die thermodynamische Kopplung bei Anwesenheit von zwei kinetischen Phasen in den elektrometrischen Messungen zu erklären.

5. Die Daten lassen sich hingegen auch mit einem Modell beschreiben, das eine kinetische Kopplung von Elektronen- und Protonentransfer beinhaltet. Häm a -Reduktion überführt die COX in einen kompetenten Zustand, der Protonentransfer erheblich beschleunigt gegenüber dem oxidierten Zustand von Häm a . Der Elektronentransfer übt hier eine kinetische Kontrolle über den Protonentransfer aus, z.B. durch kleine Konformationsänderungen oder Ausrichtung von Wassermolekülen für einen schnellen Protonentransfer durch den K-Kanal.

Zusammenfassung: Es wurde in diesem Abschnitt gezeigt, dass die spektroskopischen Daten nicht mit den elektrometrischen in einem einfachen Modell zweier reversibler Reaktionen zu vereinen sind. Verschiedene Erklärungen wurden diskutiert, die trotz dieses Widerspruches eine thermodynamische Kopplung der Reduktion von Häm a und einer Protonenaufnahme (Redox-Bohr-Proton) zulassen. Eine kinetische Kontrolle des Elektronentransfers über die Protonenaufnahme lässt sich gegenwärtig jedoch nicht ausschließen.

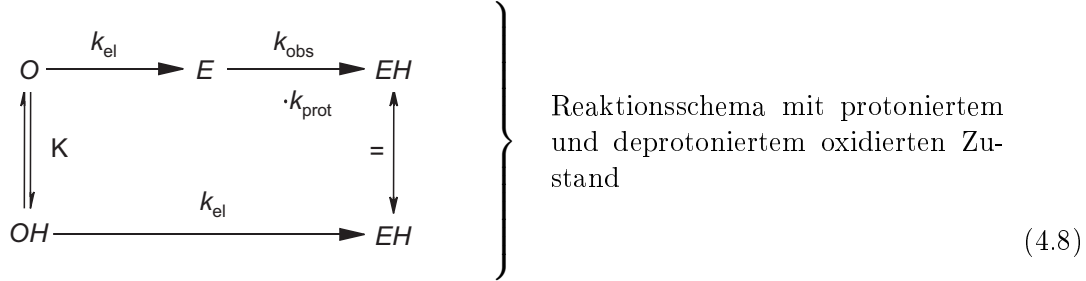
Einfluss einer protonierbaren Gruppe auf den O→E-Übergang

In den elektrometrischen Messungen wurden zum Teil erhebliche Unterschiede in der Protonenphase beobachtet (s. Abb. 3.10 auf S.49). Die beobachteten Heterogenitäten im Ausgangszustand der COX könnten hierfür einen Faktor darstellen, sicher ist der Einfluss der pH-Inkubation. Der Prozess, mit dem die Amplitude der Protonenphase während der pH-Inkubation abnahm, war überraschend langsam (140 min, s. Abschnitt 4.1.1). Daher kann spekuliert werden, ob die Heterogenitäten durch einen unterschiedlichen Protonierungsgrad der COX bestimmt werden. Die beobachteten Schwankungen in der Amplitude und der Zeitkonstante wären demnach eine Folge der langsamen Äquilibration des Ausgangszustandes, die z.B. durch eine Temperaturänderung zwischen den Bedingungen der Lagerung der COV und der Experimente ausgelöst werden könnte.

Wie wirkt sich die Anwesenheit zweier unterschiedlich protonierter Spezies auf die Spannungssignale in den elektrometrischen Messungen im O→E-Übergang aus oder gibt es eine andere Erklärung für die Abnahme der Amplitude der Protonenphase, wie sie nach der Inkubation bei niedrigem pH zu beobachten war? In dem folgenden Modell soll der zuvor behandelte Widerspruch zwischen den spektroskopischen und elektrometrischen Messungen vernachlässigt werden, da er auf die folgende Diskussion keinen qualitativen Einfluss besitzt.

Die Anwesenheit zweier unterschiedlich protonierter Zustände hilft das Verhalten der COX in den elektrometrischen Messungen zu erklären. Der Einfluss einer protonierbaren Gruppe kann an einem einfachen kinetischen Modell verdeutlicht werden. In einem sequentiellen Reaktionsmodell lassen sich die Amplituden der beiden Phasen aus den Ratenkonstanten, die mit den inversen Relaxationszeiten aus der nichtlinearen Kurvenanpassung übereinstimmen, leicht berechnen. Dies wird in Gleichung 4.8 deutlich, die den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Parametern herstellt, dem Protonierungsgrad α einer protonierbaren Gruppe X, der beobachteten Protonentransferrate, deren Größe hier ebenfalls von der protonierbaren Gruppe beeinflusst wird (k_{obs}), den einzelnen Populationen und dem beobachteten Zeitverlauf des Spannungssignals $U(t)$.

Die beiden unterschiedlich protonierten Grundzustände stehen in einem langsamen Gleichgewicht K_α . Die Reaktion startet nach Übertragung eines Elektrons von Rubpy auf Cu_A (O und OH) und mit dem anschließenden Elektronentransfer nach Häm a sowie einem Protonentransfer durch den K-Kanal:



$$K_\alpha = \frac{[O] \cdot [H^+]}{[OH]} \quad \alpha = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_s}} \quad \text{Protonierungsgrad } \alpha$$

$$k_{el} \quad \& \quad k_{obs} = \alpha \cdot k_{prot} \quad \text{Elektronen- und Protonentransferrate}$$

Definiere den Reaktionsfortschritt für Elektronen- und Protonentransfer:

$$\xi_{el} = 1 - e^{-k_{el} \cdot t}$$

$$\xi_{prot} = 1 - \frac{k_{obs}}{k_{obs} - k_{el}} \cdot e^{-k_{el} \cdot t} + \frac{k_{el}}{k_{obs} - k_{el}} \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} \quad (4.9)$$

woraus sich die einzelnen Populationen berechnen lassen:

$$\begin{aligned} O(t) &= (1 - \xi_{el}) \cdot (1 - \alpha) & OH(t) &= (1 - \xi_{el}) \cdot \alpha \\ E(t) &= (\xi_{el} - \xi_{prot}) \cdot (1 - \alpha) & EH(t) &= \xi_{el} \cdot \alpha + \xi_{prot} \cdot (1 - \alpha) \end{aligned} \quad (4.10)$$

sowie das beobachtete Spannungssignal U in Abhängigkeit der $rdla$ (d).

$$U(t) = d \cdot \xi_{el} + (1 - \alpha) \cdot (1 - d) \cdot \xi_{prot} \quad (4.11)$$

Auch wenn es sich um ein stark vereinfachtes Modell handelt, so kann es dennoch einige Phänomene erklären, die im Zusammenhang mit den Messungen nach einem pH-Sprung und ebenso in Hinblick auf die Variabilitäten der Protonenphase in ihrer Amplitude und Zeitkonstante beobachtet wurden. Nur die deprotonierte Form des oxidierten Zustandes kann ein Proton aufnehmen, so dass die beobachtete Amplitude direkt dem Deprotonierungsgrad $(1 - \alpha)$ proportional ist. Der Einfluss des Protonierungsgrades α ist in Abbildung 4.3(a) an berechneten Daten und in (b) im Vergleich zu experimentellen Daten zu sehen. Sowohl die Zeitkonstante als auch die relative Amplitude der Protonenphase zeigen eine Abhängigkeit von α , wie sie in den Gleichungen 4.8 und 4.11 definiert ist. Die experimentellen Daten sollen die Variabilität in der Zeitkonstante und der Amplitude der

4. Diskussion

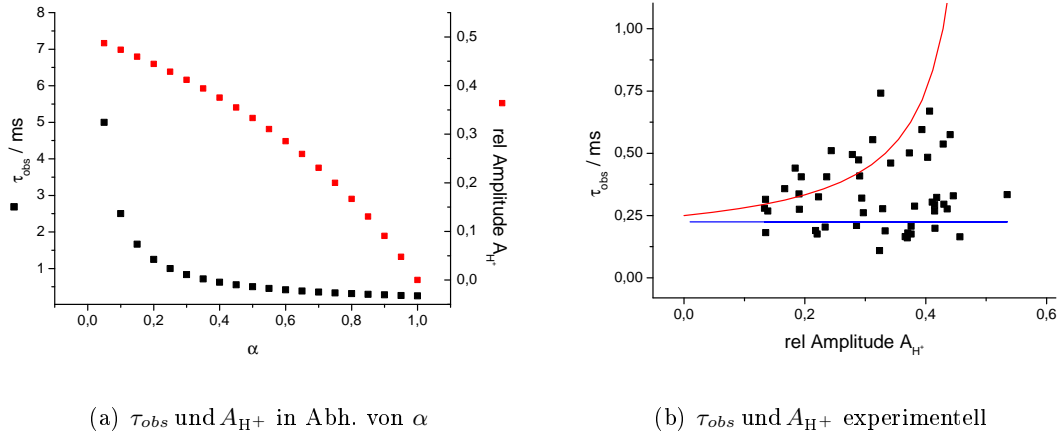


Abbildung 4.3.: In (a) wird der Einfluss einer protonierbaren Gruppe auf k_{prot} und die relative Amplitude der Protonenphase A_{H^+} dargestellt, wie er sich aus dem sequentiellen Modell in Gl.4.8 ergibt. Die Zeitkonstanten $\tau_{obs} = 1/k_{obs}$ wurden mit $k_{prot} = 3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ berechnet, A_{H^+} aus Gl.4.11 mit einer $rdla$ von 0,5. (b) Experimentell gefundene Paare für τ_{obs} und A_{H^+} aus über 50 unabhängigen Experimenten zum O→E-Übergang. Die durchgezogenen Linien weisen auf zwei verschiedene Populationen hin: Für die waagrechte Linie ist die Protonentransferrate unbeeinflusst von der Amplitude. Hängen Amplitude und Relaxationszeit von derselben protonierbaren Gruppe ab, ergibt sich für die Werte aus (a) die rote Linie. Nähere Erläuterungen finden sich im Text.

Protonenphase verdeutlichen. Beide Parameter variieren deutlich. Die eingefügten Linien zeigen den berechneten Verlauf für eine Protonentransferrate k_{prot} (—). In diesem Fall hängen die Geschwindigkeit der Protonenaufnahme und ihre Amplitude von einer gemeinsamen protonierbaren Gruppe X ab. Diese ist chemisch nicht mit dem Protonenakzeptor identisch, da bei Identität die Geschwindigkeit nicht beeinflusst werden kann. Der Fall der chemischen Identität ist ebenfalls eingezeichnet (—): Die beobachtete Zeitkonstante τ_{obs} ist unabhängig von der Amplitude, die mit zunehmendem Protonierungsgrad abnimmt.

Eine genaue Tendenz lässt sich aus den experimentellen Daten im Vergleich zu den berechneten nicht festmachen. Die Linien in Abbildung 4.3(b) weisen hingegen auf zwei verschiedene Fälle hin: Eine Gruppe der experimentellen Daten weist eine kleiner werdende Amplitude A_{H^+} mit abnehmender Zeitkonstante τ_{obs} auf, die entlang der roten Linie zu verfolgen sind und demnach eine Abhängigkeit von einer protischen Gruppe aufweisen. Die andere zeigt nur eine variable Amplitude bei gleich bleibender Zeitkonstante, die entlang der blauen Linie zu sehen sind.

Eine protische Gruppe im Kontext des katalytischen Zyklus Wie verhielte sich eine protische, unbekannte Gruppe X, deren Auswirkung auf die Protonenphase im O→E-Übergang hier diskutiert wurde, im Rahmen des Elektronentransfers in das binukleare Zentrum? Das Hydroxidion im binuklearen Zentrum stellte in allen elektrostatischen Rechnungen den Protonenakzeptor nach Aufnahme des ersten Elektrons dar (Kannt et al., 1998a; Popović and Stuchebrukhov, 2004a). Allerdings wurde in beiden Rechnungen Elektronentransfer ins binukleare Zentrum auf Cu_B angenommen, während die spektroskopischen Daten nur Reduktion von Cu_A und Häm a beobachten (Kobayashi et al., 1989; Nilsson, 1992;

Geren et al., 1995; Farver et al., 2000, 2006b). Resultierend aus diesen beiden Beobachtungen, findet man die Situation, dass die zusätzliche negative Ladung auf Häm *a* durch Protonenaufnahme kompensiert wird, im Falle einer Protonierung des an Cu_B gebundenen Hydroxidions es andererseits nicht zu einem Ausgleich durch Elektronentransfer ins binukleare Zentrum kommt. Die Cytochrom *c* Oxidase entwickelte hier einen Mechanismus der kompensierenden Ladungsaufnahme, der entfernte Gruppen miteinander koppelt.

Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass bei Darstellung des E-Zustandes mit exogenen Reduktionsmitteln das Elektron über alle Kofaktoren verteilt ist (Ruitenbergh et al., 2002). Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen selbst wird durch einen weiteren Mechanismus kontrolliert, dem Protonierungszustand einer mit beiden Redoxkofaktoren interagierenden Gruppe (Verkhovsky et al., 1995; Bränden et al., 2005; Parul et al., 2005). Die Präparation des E-Zustandes mit artifiziellen Reduktionsmitteln (H₂O₂ und CO) führt eventuell schon zur Protonierung dieser entscheidenden Gruppe mit H₂O₂ als Protonendonator für die Elektronenverteilung zwischen den Hämgruppen, oder die Anwesenheit von residuellem Kohlenmonoxid stabilisiert das Elektron auf dem binuklearen Zentrum (Oliveberg and Malmström, 1991). Die zwei unterschiedlich protonierten Formen der Cytochrom *c* Oxidase, die hier angenommen wurden, müssen also nicht notwendigerweise mit dem ersten Protonenakzeptor, dem Hydroxidion, übereinstimmen. So beobachteten Moody et al. (1991a) Äquibrierung des ersten Elektrons im E-Zustand in der schnellen Form der Rinderherzoxidase, nicht hingegen in der langsamen Form. Sie interpretierten ihre Ergebnisse mit dem Übergang zwischen diesen beiden Formen. Auch dieser Übergang wird durch eine pH-Änderung hervorgerufen. Für das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* konnten hier nun auch Heterogenitäten nachgewiesen werden, die sich jedoch zum Teil von dem Verhalten des Rinderherzenzyms unterscheiden. Dennoch ist zur Erklärung der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse die Hypothese von zwei verschiedenen Formen attraktiv mit den folgenden Konsequenzen für den Ausgangszustand der elektrometrischen Messungen:

- Die protonierbare Gruppe X beeinflusst das Ausmaß des Protonentransfers zum binuklearen Zentrum. Im protonierten Zustand wird das Hydroxidion schneller protoniert (größere k_{obs} in Gl. 4.8). Allerdings führt dieser Zustand auch zu einer verstärkten Leckrate für Protonen ins binukleare Zentrum und zur Protonierung des Hydroxids, so dass es zu einer kleineren Amplitude in der Protonenphase kommt.
- Eine zusätzliche Aufnahme einer positiven Ladung durch Protonierung des Hydroxids wird durch Deprotonierung von X teilweise kompensiert. Im deprotonierten Zustand von X bleibt die Protonentransferrate unbeeinflusst, während sich hingegen die relative Amplitude ändert (keine Protonenaufnahme).
- Somit kommt es zu der Situation, dass Ausmaß und Geschwindigkeit nicht nur vom aktuellen Protonierungsgrad, sondern auch von der Vorgeschichte (eventuelle Protonierung und Deprotonierung von X) beeinflusst wird. Die beobachteten Variabilitäten in den elektrometrischen Messungen (s. Abb. 4.3(b)) sind also Ergebnis dieser zwei konkurrierenden Prozesse. Da beide sehr langsam (s. pH-Sprung) verlaufen und durch kleine Veränderungen in den Versuchsbedingungen leicht beeinflusst werden, ist der Anfangszustand nach Rekonstitution heterogen.

4.1.2. Die Temperaturabhängigkeit der Elektronen- und der Protonenphase

Die Temperaturabhängigkeit des Elektronen- und Protonentransfers beim $O \rightarrow E$ -Übergang wurde in dieser Arbeit unter verschiedenen Bedingungen und an unterschiedlichen Enzymen gemessen. Diese liefert weiteren Einblick in die Prozesse des Ladungstransfers. Aufgrund ihrer Größe und Masse verhalten sich Elektronen und Protonen unterschiedlich, daher werden hier die beiden Reaktionen zunächst getrennt voneinander betrachtet, bevor die Frage der Kopplung wieder in das Zentrum der Diskussion gestellt wird.

Die Temperaturabhängigkeit des Elektronentransfers

Die Elektronentransfertheorie, ursprünglich von R. Marcus entwickelt (Marcus, 1964), ermöglicht die Berechnung oder Beschreibung der Elektronentransferrate in Abhängigkeit von wenigen Parametern. Sie ermöglicht daher die Vergleichbarkeit verschiedener Systeme, sowie den Einfluss der experimentellen Bedingungen auf diese. Bei Betrachtung eines Systems im Rahmen der Elektronentransfertheorie wird die potentielle Energie des Ausgangs- und Endzustandes in einer einzigen effektiven Kern-Reaktionskoordinate zusammengefasst, die sowohl die Koordinaten des Elektronendonors und -akzeptors als auch das umgebende Medium, das Proteingerüst der COX, zusammenfasst. Im einfachsten Fall eines harmonischen Oszillators erhält man für den Ausgangs- und Endzustand zwei Parabeln, die die potentielle Energie des Systems beschreiben (s. Abb. 4.4). Elektronenübertragung findet am oder in der Nähe des Schnittpunktes der beiden Parabeln statt (Franck-Condon-Prinzip). Im nichtadiabatischen Fall befindet sich der Ausgangszustand im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung, d.h. eine schwache Kopplung zwischen Ausgangs- und Endzustand. Unter Berücksichtigung des Hochtemperaturlimits (Hopfield, 1974) erhält man die klassische Marcus-Gleichung (Gl. 4.12). Man erkennt, dass die Elektronentransferrate k_{et} von der elektronischen Kopplung H_{RP} der beiden Zustände und dem Franck-Condon-Faktor, FC , abhängt, der die Überlappung der Kernwellenfunktionen wiedergibt. Das elektronische Kopplungsmatrixelement (Gl. 4.14) ist proportional zur Distanz d der Redoxpartner und der Energiebarriere V , durch die das Elektron mit der Masse m dringt. Die Überlappung der elektronischen Wellenfunktion fällt exponentiell mit der Distanz und dem Abfallkoeffizienten β ab. Für Proteine wurde für β ein Wert von $1,4 \text{ \AA}$ in vielen Fällen bestimmt (Moser et al., 1992), der die Distanzabhängigkeit im intramolekularen Elektronentransfer in Proteinen betont (Page et al., 1999). Der Wert des Abfallkoeffizienten liegt in Proteinen zwischen den Werten, die für durch Vakuum getrennte Redoxpartner und welche mit einer kovalenten Brücke gefunden wurden. Durch Berücksichtigung der Natur des Elektronentransferweges und Unterscheidung zwischen einer kovalenten Brücke, einer Wasserstoffbrückenbindung oder einem Vakuum kann die reine Distanzabhängigkeit der Elektronentransferrate noch genauer vorhergesagt werden (Beratan et al., 1992; Onuchic et al., 1992).

Die Aktivierungsenergie E_A steht in direktem Bezug zur freien Energie ΔG und zur Reorganisationsenergie λ , der Energie, die aufgebracht werden muss, um auf die elektronische Änderung des Systems zu reagieren (Gl. 4.15). Diese wird durch die Proteinumgebung bestimmt und ist eine der Kenngrößen für die Diskussion des Elektronentransfers. Die Reorganisationsenergie lässt sich aufteilen in die *inner sphere* Reorganisationsenergie, die Änderungen der Schwingungszustände des Proteins und seiner Kofaktoren enthält, und die *outer sphere* Reorganisationsenergie, die Änderungen in der Polarisierung der Umgebung

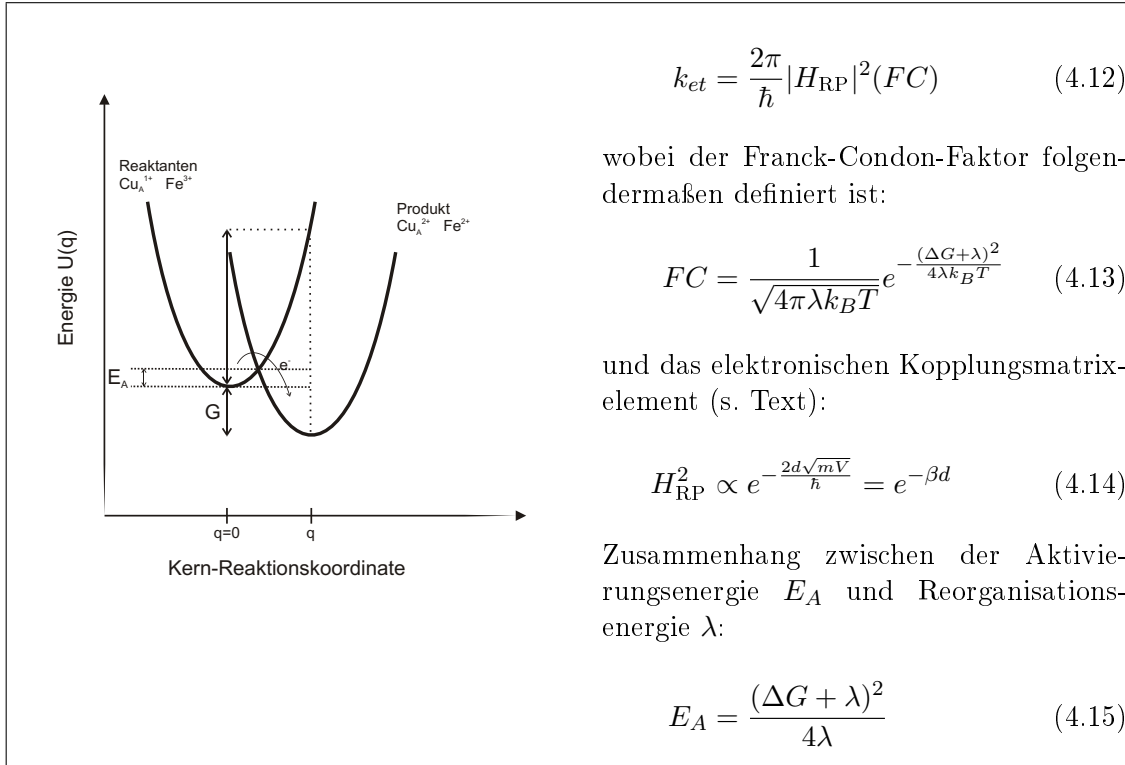


Abbildung 4.4.: Elektronentransfertheorie und die Ableitung der Elektronentransferrate k_{et} mit Hilfe der semiklassischen Marcus-Gleichung (4.12). Einzelheiten sind im Text beschrieben.

wiedergibt.

Tabelle 4.1 listet die bisher gefundenen experimentellen Werte für die Marcus-Parameter auf. Bezüglich des elektronischen Kopplungsmatrixelement H_{RP} stellen sich erwartungsgemäß dieselben Werte aus den verschiedenen Messungen ein, da in den verschiedenen Oxidasen die Geometrie und Distanz zwischen Cu_A und Häm *a* übereinstimmen. Dieser Parameter wird in dem betrachteten Temperaturbereich als temperaturunabhängig betrachtet, Effekte aufgrund der Wärmeausdehnung oder Änderung von Konformationen mit Einfluss auf den Elektronentransferweg werden also vernachlässigt. Die Hauptwege des Elektronentransfers von Cu_A nach Häm *a* sind von verschiedenen Gruppen berechnet und beschrieben worden (Regan et al., 1998; Medvedev et al., 2000; Tan et al., 2004). Der Hauptweg (s. Abb. 4.5) startet vom Cu_A -Liganden His224 und erstreckt sich weiter über die Argininreste 473 und 474.

Auch die Werte für die Reorganisationsenergie λ stimmen gut zwischen den verschiedenen Messungen überein. Aufgrund der großen Distanz von 19 Å zwischen den Metallzentren der Kofaktoren und der über den Temperaturbereich geringen Triebkraft von 18 meV ist für einen schnellen Elektronentransfer eine geringe Reorganisationsenergie unerlässlich. Die Werte zwischen 0,3-0,4 eV stellen im Vergleich zu anderen Proteinsystemen eine sehr geringe Barriere dar (Winkler, 1992), die Reorganisationsenergien um ≈ 1 eV besitzen. Die Redoxkofaktoren in der Cytochrom *c* Oxidase besitzen intrinsisch eine niedrige, *inner sphere* Reorganisationsenergie λ_i (Sigfridsson et al., 2001; Randall et al., 2000): Die Kofaktoren Cu_A und Häm *a* sorgen für eine hohe Delokalisierung der Ladung und beide unterliegen kei-

Reaktion	Technik	H_{RP}^2 / eV ²	λ / eV
$\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ (<i>P.d.</i>)	<i>BLM</i> ¹	$10^{-6,3 \pm 0,2}$	0,41 ($\pm 0,1$)
$\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ (<i>P.d.</i>)	<i>PulsRadiolyse</i> ²	$10^{-6,5}$	0,32
$\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ (Rinderherz)	<i>PulsRadiolyse</i> ³	$10^{-6,5}$	0,40
$\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ (Rinderherz)	<i>PulsRadiolyse</i> ⁴	–	0,46
$\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ (<i>Rh.sphaer.</i>)	<i>FlashPhotolyse</i> ⁵	$10^{-6,4}$	0,3
$\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } b$ (<i>Th.th.</i>)	<i>BLM</i> ⁶	–	0,68 ($\pm 0,1$)
$\text{Häm } a \rightarrow \text{Häm } a_3$ (Rinderherz)	<i>FlashPhotolyse</i> ⁷		0,2

¹Daten aus der Temperaturabhängigkeit der Elektronentransferrate

²Daten aus Farver et al. (2006b)

³Daten aus Farver et al. (2000)

⁴Daten berechnet aus Kobayashi et al. (1989)

⁵Daten aus Brzezinski (1996)

⁶Daten berechnet aus der Aktivierungsenergie in Gl. 4.15

⁷Daten aus Jasaitis et al. (2005)

Tabelle 4.1.: Marcus-Parameter für intramolekularen Elektronentransfer aus verschiedenen Systemen und Messungen. Cytochrom *c* Oxidasen aus verschiedenen Organismen wurden für die Untersuchungen verwendet, *P.d.* *Paracoccus denitrificans*, *Th.th.* *Thermus thermophilus* und *Rh.sphaer.* *Rhodobacter sphaeroides*.

ner Änderung der Koordinationssphäre ihrer Liganden hinsichtlich Anzahl und Geometrie aufgrund einer Redoxänderung. Diese Eigenschaften, sowie die Einbettung in das hydrophobe Proteinmedium sind wesentliche Faktoren und Voraussetzung für einen schnellen Elektronentransfer zwischen Cu_A und Häm *a* während des O→E-Überganges.

Die Temperaturabhängigkeit und der Isotopeneffekt des Protonentransfers

Vergleich mit anderen Systemen Aktivierungsenergie und kinetischer Isotopeneffekt sind zwei kinetische Parameter, die die Natur des beobachteten Prozesses beschreiben und besser verstehen helfen. Während die Bedeutung von Protonentransferreaktionen für die verschiedensten Proteinsysteme nicht angezweifelt wird, ist in den meisten Systemen der detaillierte molekulare Mechanismus nicht geklärt (Ferguson, 2000). Aufgrund der dynamischen Natur und der Beteiligung vieler Gruppen am Protonentransfer über eine große Distanz stellt dieser eine konzeptionelle Herausforderung dar. So sind die transienten Zustände meist nicht zu erfassen und Einblicke in diese mit Hilfe von Simulationen sind noch rar (z.B. König et al. (2006)). Daher bleiben die kinetischen Parameter ein wichtiges Hilfsmittel zur Beschreibung eines Prozesses. Zu ihrer besseren Einordnung können sie mit anderen Systemen verglichen werden:

- Protonentransport in Wasser besitzt eine wesentlich niedrigere Aktivierungsenergie von 8,6-12,9 kJ·mol⁻¹ und einen Isotopeneffekt von 1,4 bei Raumtemperatur (Robinson and Stokes, 1959). Abzüglich der Eigendiffusion von Wasser besitzt das Proton eine Diffusionskonstante von $7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Um den schnellen Protonentransport in Wasser zu erklären, wird das Proton durch Ketten von Wassermolekülen transpor-

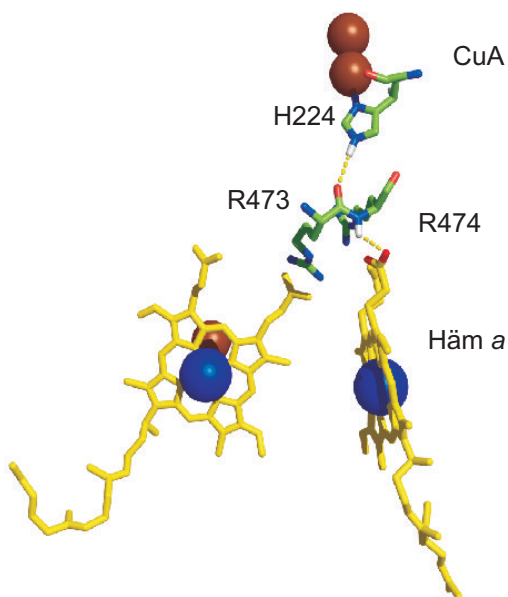


Abbildung 4.5.: Der Hauptelektronentransferweg von Cu_A nach Häm a : H_{RP} lässt sich mit Hilfe des Programmes HARLEM bestimmen (Kurnikov and Beratan, 1996). Der Wert von $7,57 \cdot 10^{-4}$ eV stimmt mit dem experimentellen Wert und der nächsten Verbindung zwischen den Redoxpartnern von $11,6 \text{ \AA}$ überein, bzw. einem Abfallkoeffizienten β von $1,24 \text{ \AA}^{-1}$ (vgl. auch Farver et al., 2006b).

tiert, dem Grotthus-Mechanismus, das zu einem konzertierten Protonenhüpfen führt. Hierbei sind letztlich viele Wassermoleküle in einem Transportschritt verbunden. Das Proton selbst liegt in Wasser nicht als eigene Spezies vor, sondern befindet sich vielmehr in zwei verschiedenen Zuständen, dem Eigen-Kation (H_9O_4^+ , Eigen, 1964) oder dem Zundel-Kation (H_5O_2^+ , Zundel and Fritsch, 1986). Agmon (1995) deutete darauf hin, dass Änderungen in den Bindungszuständen um das Proton zu höheren Werten in der Aktivierungsenergie und zu einem höheren Isotopeneffekt führen müssten. Statt dessen schlug er einen Mechanismus vor, bei dem Wasserstoffbrückenbindungen in der zweiten Wasserhülle gebrochen und nach Übertragung des Protons auf das Wassermolekül der früheren ersten Wasserhülle wieder geknüpft werden. Das Prinzip konnte mit theoretischen Berechnungen bestätigt werden (Marx et al., 1999), ist aber wahrscheinlich noch komplexer und inkohärenter (Voth, 2006), was für den Vergleich hier aber keine Rolle spielen soll.

- Protonentransport in Proteinen offenbart unterschiedliche, System spezifische Charakteristika. Gemein ist die Betrachtung des Protonenkanals als lineare Anordnung von Wasserstoffbrückenbindungen. Die Partner für die Wasserstoffbrückenbindungen stammen einerseits von hydrophilen Gruppen der Aminosäuren oder von Wassermolekülen, die im Protonenkanal lokalisiert sind. Für einen funktionalen Protonentransfer wird zunächst das Proton eines Donors zum Akzeptor übertragen, woraufhin sich der vormalige Donor umorientieren muss, um ein weiteres Proton empfangen zu können (Nagle and Morowitz, 1978). Ein Beispiel hierfür ist Gramicidin A, ein Pentadekapeptid. Protonentransport via einer Wasserkette besitzt eine Aktivierungsenergie von $20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und einen Isotopeneffekt von 1,3 (Akeson and Deamer, 1991). In Simulationen wurde die Umorientierung der Wasserkette, die zu einem konsekutiven Bindungsdefekt nach dem Protonentransfer führt, als Schritt mit der höchsten Energiebarriere detektiert. Diese war in ihrer Größe mit den experimentellen Werten vergleichbar (Pomès and Roux, 2002). Während der Isotopeneffekt also noch ver-

gleichbar mit dem Wert in Wasser ist, steigt die Aktivierungsenergie in Anwesenheit der Peptidhülle.

- Eines der am besten untersuchten Systeme für Protonentransport in Proteinen stellt Bakteriorhodopsin dar. In elektrometrischen Messungen wurde für die Schritte mit Protonentransfer eine Aktivierungsenergie von $\sim 50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und eine Verkleinerung der Ratenkonstanten um den Faktor 1,7-2,9 in D_2O gemessen (Fahr et al., 1981). Protonierung des primären Protonenakzeptors D85 nach Retinalisomerisierung führt zu einer Konformationsänderung von R82, so dass das Proton sich nun in die Wasserhülle eines protonierten Wasserclusters einfügen kann (Garczarek and Gerwert, 2006). Für einen funktionalen Protonentransfer sind hier im Protein gebundene Wassermoleküle von großer Bedeutung, sowie der Einfluss von hydrophilen Aminosäuren, die zur Solvatisierung von Protonen und zum Aufbau einer Kette von Wasserstoffbrückenbindungen beitragen.
- In den angeführten Beispielen steigt die Aktivierungsenergie mit der Größe des Systems. Es werden unterschiedliche Schritte geschwindigkeitsbestimmend. In Protonenkanälen müssen die Protonen leitenden Strukturen in einem zeitlich und örtlich kohärenten Prozess entstehen. Hierbei kann entweder der Nukleationsprozess kleinerer leitender Segmente, z.B. die Ausrichtung von Wassermolekülen, oder die Umorientierung von Seitenketten der Proteinumgebung oder von Wassermolekülen limitierend sein. Die Energiebarriere für die Umorientierung kann aufgrund der engeren Umgebung des Kanals größer als in Wasser ausfallen. Weiterhin kann auch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen unterschiedlicher Stärke Einfluss auf die Geometrie des protonenleitenden Gerüsts oder auf den Übergangszustand für den Protonentransfer besitzen (*low-barrier hydrogen bonds*, Cleland, 2000). Der Isotopeneffekt hingegen ist vergleichbar in den Beispielen und auch in den Messungen an der COX, sowie anderen Systemen mit Protonenleitung (DeCoursey and Cherny, 2000). Ursache hierfür ist zum einen der Effekt auf die Rotation des Wasserstoffatoms um den Sauerstoff, was sich wie in Wasser beobachtet mit $\omega_H/\omega_D = \sqrt{2}$ niederschlägt, zum anderen gibt es einen Isotopeneffekt quantenmechanischer Natur auf die Aufspaltung der Potentialflächen am Übergangszustand (Einzelheiten s. Kornyshev et al., 2003).

Aktivierungsenergie des Protonentransfers in der COX Im Gegensatz zur Temperaturabhängigkeit des Elektronentransfers ist über die der Protonenaufnahme im Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase wenig hinsichtlich der hier betrachteten Parameter bekannt. Hallén et al. (1994) untersuchten in Flash-Photolyse Experimenten am MVCO-Enzym den Elektronenrückfluss von Häm *a* nach Cu_A . Diese Phase besaß einen kinetischen Isotopeneffekt von $2 \sim 3$ und eine Aktivierungsenergie von $42 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und ist mit Protonenabgabe über den K-Kanal verbunden (Ädelroth et al., 1996, 1998). Weiterhin wurde zuvor auch die Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffreduktion ausgehend vom vollständig reduzierten Enzym und vom MVCO-Enzym untersucht. Die Werte für den F→O-Übergang betrugen hier $54 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, bzw. $20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Oliveberg et al., 1989). Bisher sind keine Daten über die Temperaturabhängigkeit der Protonenaufnahme aus elektrometrischen Messungen bekannt. Neben den Aktivierungsenergien für Elektronen- und Protonentransfer sind durch Licht induzierte Änderungen an den Hämgruppen ebenfalls von der Temperatur abhängig ($20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, Hallén and Brzezinski (1994)); diese wurden als Ablösung eines Liganden von

Cu_B interpretiert.

Der Wert von $46 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, der in dieser Arbeit für den Protonentransfer durch den K-Kanal bestimmt wurde (s. Tab. 3.1 auf S.41), ist hierbei in guter Übereinstimmung mit den Werten, die für Protonentransfer über den K-Kanal in den Flash-Photolyse Experimenten gemessen wurden: Wie in Bakteriorhodopsin und anderen Protonenkanälen in Proteinen liegt die Aktivierungsenergie für den Protonentransport über der von Wasser. *Per se* kann hierdurch nicht auf den Schritt mit der höchsten Energiebarriere geschlossen werden. Wie erwähnt besteht die Möglichkeit, dass dieser in der Ausbildung einer geeigneten Protonentransferkette liegt oder/und in einer Isomerisierung der Proteinseitenketten. In FT-IR Differenzmessungen nach Photolyse von CO aus dem MVCO-Enzym, das zu einem partiellen Protonenrückfluss über den K-Kanal führt, sind im Proteinspektrum Banden im Bereich von Amid I und II zu erkennen (Rost et al., 1999). Diese könnten eine solche Isomerisierung von Seitenketten wie Lysin oder Threonin (s.u.) unterstützen, sind aber nicht aufgelöst genug aufgrund der spektralen Überlagerung und Dominanz der Hämgruppen (Hellwig et al., 1999a; Behr et al., 1998).

Aktivierungsenergie in der K354M-Mutante Über die Temperaturabhängigkeit der Protonenaufnahme via den D-Kanal ist bisher nichts bekannt. Diese ist experimentell schwieriger zugänglich, es bietet sich jedoch der $\text{F} \rightarrow \text{O}$ -Übergang an, bei dem sowohl das chemische als auch das gepumpte Proton über den D-Kanal aufgenommen werden. Aufgrund der Schwierigkeiten beim Einstellen des Zustand mit H_2O_2 konnte diese vergleichende Messung hier leider nicht durchgeführt werden. Statt dessen verschafft das Verhalten der K354M-Mutante und ihrer Temperaturabhängigkeit Einblick. Wie gezeigt (s. Abb. 3.5(a) auf S.39 oder Ruitenberget al., 2000), besitzt sie einen ausgeprägten Defekt in der Protonenaufnahme, sowohl in ihrer Kinetik als auch in ihrem Ausmaß. Aus elektrometrischen Messungen an einer Doppelmutante D124N/K354M, bei der beide Protonenkanäle blockiert sind und die keine residuelle Protonenphase mehr besitzt, wurde gefolgert, dass die Protonenaufnahme in der K354M-Mutante über den D-Kanal erfolgt (Ruitenberget al., 2000).

Die Aktivierungsenergie liegt in der Mutante deutlich unter der des Wildtyps ($28 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ vs. $46 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, Tab. 3.1). Gleichzeitig sinkt jedoch auch der präexponentielle Faktor in der Mutante dramatisch: Während die Mutation zu einem Absenken der Energiebarriere führt, erfordert es eine höhere Entropieänderung, um den Übergangszustand zu erreichen. Diese Situation ist vergleichbar mit einer Mutante in Bakteriorhodopsin, D96N. Das Fehlen des Protonendonors für die deprotonierte Schiff-Base lässt das M-Intermediat langsamer zerfallen, was eine hohe negative Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger als Ursache besitzt (Tittor et al., 1989). Für die Interpretation lassen sich zwei Szenarien abzeichnen: Der Protonentransfer durch den D-Kanal erfolgt mit einer niedrigeren Aktivierungsbarriere als durch den K-Kanal und einer erhöhten Entropieänderung. Denkbar ist jedoch auch, dass die residuelle Protonenaufnahme über den K-Kanal erfolgt, die durch eine weitere Mutation im D-Kanal, D124N, noch weiter vermindert wird. In diesem Falle würde die Seitenkette des Lysins 354 beträchtlich zur Energiebarriere beitragen. Die große negative Aktivierungsentropie könnte in beiden Fällen in einer erhöhten Ordnung von Wassermolekülen liegen, um einen Protonentransport zu gewährleisten.

Isotopeneffekt des Protonentransfers durch den K-Kanal Bei Untersuchungen zur Protonenaufnahme während des katalytischen Zyklus der COX wurde in verschiedenen Mes-

sungen der kinetische Isotopeneffekt in verschiedenen Teilschritten untersucht. Hallén and Nilsson (1992) fanden bei der Reaktion der vollständig reduzierten Oxidase mit Sauerstoff Isotopeneffekte im Bereich von 1,4-2,5; dabei zeigte die langsamste Phase (F→O-Übergang) die größte Verlangsamung in D₂O. Die Beobachtung des höchsten Isotopeneffektes (4 ~ 7) in diesem Teilschritt wurde auch später in spektroskopischen Messungen (Zaslavsky et al., 1998; Karpefors et al., 2000b) nachgewiesen, wobei dieser in einem einzigen Schritt, nämlich dem Protonentransfer von E278 liegt (Karpefors et al., 2000a). Zusammen mit den Informationen über den Isotopeneffekt des K-Kanals (~ 2, s. Tabelle 3.1 auf S.41 und Ruitenbergh et al., 2000) kristallisierte sich ein Bild von der Cytochrom *c* Oxidase, das einen Protonentransfer in den Zugangs- (D & K) und Ausgangskanal mit einem kinetischen Isotopeneffekt von 2 beinhaltet sowie einem erhöhten Effekt (7) bei der Übertragung des zu pumpenden Protons in den Ausgangskanal (Salomonsson et al., 2005). Der hohe Effekt in diesem Schritt kann mit einer Erniedrigung der Nullpunktsenergie der Schwingungszustände erklärt werden, der zu einem Isotopeneffekt um ~ 7 führte (Bell, 1974), obwohl auch als Erklärung Protonentransfer durch eine hoch geordnete, Eis ähnliche Struktur angeführt wurde (Wikström, 1998). Übereinstimmend mit den früheren elektrometrischen Messungen wurde ein Isotopeneffekt zwischen 1,5-2 über den gesamten Temperaturbereich für den Protonentransport durch den K-Kanal beobachtet. Der geringe Wert, ähnlich dem in Wasser gefundenen, bestätigt einen schnellen Protonentransfer durch die Protonenkanäle der COX, der nicht durch das Brechen und Knüpfen einer spezifischen Wasserstoffbindung zustande kommt, sondern seinen Ursprung entweder in Umlagerung von Wassermolekülen oder Seitenketten besitzt.

Die Temperaturabhängigkeit des O→E-Überganges in der *ba*₃-Oxidase

Die *ba*₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus* weist in den elektrometrischen Messungen im O→E-Übergang wie die *aa*₃-Oxidase zwei Phasen auf, die analog einem Elektronentransfer und der Aufnahme eines kompensierenden Protons zugeschrieben werden (s. Abb. 3.5(d) auf S.39). Während ein Isotopeneffekt von ~ 2 für die Protonenphase festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt), besitzt im Gegensatz zur *aa*₃-Oxidase eine Inkubation bei niedrigem pH keinen Einfluss auf die Protonenphase und Cyanid keinen inhibierenden Effekt. Dies ist in Übereinstimmung mit spektroskopischen Messungen, in denen Cyanid nur an das reduzierte Fe^{II} binden konnte (Surerus et al., 1992; Nicholls and Soulimane, 2004). Unter den experimentellen Bedingungen mit Ferricyanid als Redox-Puffer liegt das Enzym oxidiert vor, so dass keine Cyanidbindung erfolgt. Diese Tatsache unterstützt nochmals, dass auch die Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* vollständig oxidiert vorliegt (s. Abschnitt 4.1.1 auf S.84).

Die *ba*₃-Oxidase weist veränderte Mittelpunktspotentiale auf. Im Gegensatz zur *aa*₃-Oxidase liegt das Potential von Häm *a*₃ über dem von Häm *b* in elektrochemischen Messungen (Hellwig et al., 1999b). Dieser Verhalt war auch in Puls-Radiolyse Experimenten feststellbar, in denen im O→E-Übergang das Elektron von Häm *b* auf Häm *a*₃ übertragen wurde (Farver et al., 2006a). Auch wenn die Werte aus den elektrochemischen und den Puls-radiolytischen Messungen nicht quantitativ übereinstimmten, so weisen beide auf eine veränderte Elektronenverteilung in der *ba*₃-Oxidase hin. Die Reduktion und Reoxidation von Häm *b* in den Puls-Radiolyse Daten verlief in zwei Phasen mit Relaxationszeiten von $\tau_1 = 89 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 1,3 \text{ ms}$. In den hier durchgeführten elektrometrischen Messungen betrugen die beobachteten Zeitkonstanten $\tau_1 = 21 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 0,2 \text{ ms}$. Aufgrund der großen

Unterschiede kann eine eindeutige Zuordnung zwischen den spektroskopischen und den elektrometrischen Parametern zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht getroffen werden. Die Frage, ob die Häm *b*-Reduktion oder Reoxidation mit einer Protonenaufnahme verknüpft ist, bleibt offen.

Unter der Annahme einer temperaturunabhängigen Gleichgewichtskonstante der Elektronenverteilung im E-Zustand zwischen Cu_A und Häm *b* konnte mit Hilfe der Daten aus den spektroskopischen Messungen (Farver et al., 2006a) das erste Mal die Reorganisationsenergie abgeschätzt werden (s. Tabelle 4.1 auf S.98). Die Werte des thermophilen Enzyms lagen höher im Vergleich zur *aa*₃-Oxidase. Im Gegensatz hierzu lag die Aktivierungsenergie des Protonentransfers in der Oxidase aus *Thermus thermophilus* ein wenig unter der aus *Paracoccus denitrificans* (vgl. Tab. 3.1). So finden sich trotz der hohen Übereinstimmung der beiden verschiedenen Oxidasen viele kleine Unterschiede. Inwieweit sie auch zu mechanistischen Differenzen beitragen bleibt eine wichtige Frage.

4.1.3. Die Rolle des K-Kanals

Einfluss des K-Kanals in verschiedenen Reaktionsschritten Die Bedeutung des K-Kanals ist zwar in vielen experimentellen Studien erkannt worden, aber in den meisten molekularen Modellen des Oxidasemechanismus spielt er keine große Rolle. Aufgrund der Tatsache, dass durch den D-Kanal sowohl das chemische als auch das gepumpte Proton im F→O-Übergang transportiert werden können (Konstantinov et al., 1997), wurde geschlossen, dass er für den Mechanismus des Pumpens unerheblich ist und seine Rolle *nur* in der Bereitstellung der kompensierenden Protonen während der reduktiven Phase liegt. Im Kehrschluss bedeutet dies, dass jeder Pumpschritt derselben Choreographie folgt, die unabhängig vom K-Kanal erfolgt. Während dies für die Bewegung des Pumpelementes, das das Proton über die Hämbarriere zur Pumpseite dirigiert, richtig sein mag, ist die Kontrolle und die Energetik in den einzelnen Teilschritten wohl unterschiedlich.

Offensichtlich wird die Vernachlässigung des K-Kanals insbesondere bei der Wahl der Zustände in theoretischen Berechnungen: Als Ergebnis des O→E-Übergang wird vorausgesetzt, dass das Elektron sich im E-Zustand auf Cu_B befindet (z.B. Siegbahn et al., 2003; Olsson et al., 2005; Quenneville et al., 2006), während experimentell wie angeführt Häm *a*-Reduktion beobachtet wird. Dabei ist auf die Bedeutung der Elektronenäquilibration zwischen Häm *a* und Häm *a*₃ in verschiedenen Studien hingewiesen worden, angefangen von der Tatsache, dass für Elektronentransfer ins binukleare Zentrum Cu_A und Häm *a* reduziert vorliegen müssen (Fabian et al., 1987). Dieser Schritt steht unter der Kontrolle einer Protonierungsreaktion (Verkhovsky et al., 1995), an der wie vorgeschlagen der K-Kanal direkt oder indirekt beteiligt ist (Parul et al., 2005; Antalík et al., 2005). Somit wäre bei einem realistischen Modell also zu berücksichtigen, dass neben der Protonenaufnahme durch die Häm *a*-Reduktion im O→E-Übergang noch eine weitere Protonierungsreaktion für einen Elektronentransfer ins binukleare Zentrum erfolgen muss. Die Kontrolle darüber stellt einen wesentlichen mechanistischen und kontrollierenden Punkt dar und hierbei könnte der K-Kanal beteiligt sein.

Modell: Der K-Kanal im O→E-Übergang Die Diskussion über die Rolle des K-Kanals soll die bisherigen Teile, die pH- und die Temperaturabhängigkeit zusammenfassen und die Bedeutung dieser Protonen leitenden Struktur beleuchten. Anhand einer Reihe von

Untersuchungen an Mutanten des K-Kanals, insbesondere K354M, wurde gezeigt, dass der K-Kanal an einer Reihe von Phänomenen beteiligt ist:

- Die Mutation K354M führt zu einem Enzym ohne Aktivität in *Paracoccus denitrificans* (Pfitzner et al., 1998) und *Rhodobacter sphaeroides* (Hosler et al., 1996). Während die Mutante Peroxidaseaktivität zeigt und somit den oxidativen Teilzyklus mit H_2O_2 als Elektronenakzeptor durchlaufen kann (Vygodina et al., 1998), ist die Reduktion des binuklearen Zentrums drastisch verlangsamt (Jünemann et al., 1997). Der Kanal wird für die Aufnahme der beiden kompensierenden Protonen in der reduktiven Phase ($\text{O} \rightarrow \text{R}$) benötigt, wie deutlich in den elektrometrischen Messungen gezeigt worden ist (Ruitenbergh et al., 2000, 2002).
- Mehrere Effekte sind in den Protonenbewegungen in den einzelnen Übergängen in der K354M-Mutante beobachtet worden: In der Reaktion mit Sauerstoff ausgehend vom vollständig reduzierten Enzym wählt die Mutante eine andere Route für die Reduktion von Sauerstoff. Nach Sauerstoffbindung ist der sogenannte P_R -Zustand destabilisiert und in den transienten Messungen nicht zu erkennen, sondern das Enzym geht direkt in den F-Zustand über (Bränden et al., 2001). Dies geht einher mit einer veränderten pH-Abhängigkeit bei der Reaktion mit H_2O_2 . In der Mutante wird die F' -Form, die sich in der Anwesenheit eines Protons in der Nähe des binuklearen Zentrums gegenüber der P_M -Form unterscheidet, nicht gebildet, statt dessen zeigt sie ebenfalls einen Übergang in den F-Zustand (Pecoraro et al., 2001). Andererseits ist Protonenfreisetzung in den Elektronenrückflusseexperimenten ausgelöst durch die Photolyse des MVCO-Zustandes jedoch gestört (Ädelroth et al., 1998; Sigurdson et al., 2002). Eine Deprotonierungsreaktion in der Nähe des binuklearen Zentrums findet in der Mutante demnach nicht mehr statt.
- Die am K-Kanal beteiligten Aminosäuren führen je nach Position zu einem unterschiedlichen Phänotyp. Hinsichtlich des Eingangs des K-Kanals scheint es Unterschiede abhängig von der Herkunft der COX zu geben. Während für das Enzym aus *Rhodobacter sphaeroides* eine Mutation der Aminosäure E101^{II} aus Untereinheit II auf der cytoplasmatischen Seite zu einer Blockade des Kanals führte (Bränden et al., 2002; Tomson et al., 2003), weist die entsprechende Mutante in *Paracoccus denitrificans* (E78^{II}) Wildtypcharakter auf (Richter et al., 2005). Mutationen am Eingang des Kanals besitzen keinen großen Einfluss auf die Aktivität (S291, H292, Pfitzner et al., 1998), während Veränderungen an den darüber liegenden, zum binuklearen Zentrum hinführenden Aminosäureresten (K354, T280) zum Aktivitätsverlust führen. Ein Grund könnte die Ausbildung verschiedener Protonenwege hin zum K354 durch verschiedene Wassermoleküle und Seitenketten sein, wie es auch in Simulationen der Wasserdynamik beobachtet wurde (Olkhova et al., 2004; Cukier, 2005).

Abbildung 4.6 entwirft ein mögliches Szenario für den $\text{O} \rightarrow \text{E}$ -Übergang. Der K-Kanal führt zum binuklearen Zentrum über eine Reihe von protischen Seitengruppen, an deren Ende sich ein Hydroxidion an Cu_B gebunden befindet (Fann et al., 1995). Die Protonen leitende Kette setzt sich aus den Aminosäureresten K354, T351 sowie einem Wassermolekül, der Hydroxylgruppe der Farnesylethylseitenkette von Häm a_3 und Y280 zusammen. Elektrostatische Berechnungen haben gezeigt, dass nach Aufnahme des ersten Elektrons das Hydroxidion, das als vierter Ligand von Cu_B fungiert, zu Wasser protoniert wird (Kannt

et al., 1998a; Popović and Stuchebrukhov, 2004a). Im Ausgangszustand (4.6(a)) ist die Seitenkette von K354 deprotoniert (Kannt et al., 1998a). Elektronentransfer von Cu_A nach Häm *a* (4.6(b)) zieht Protonentransfer nach sich. Zwischen den Resten K354 und T351 wurde bisher in keiner Struktur von Häm-Kupfer-Oxidasen ein Wassermolekül nachgewiesen. Die Distanz zwischen den beiden Aminosäuren ist jedoch zu groß, als dass direkter Protonentransfer stattfinden kann. Hierfür ist eine Ausbildung einer neuen Wasserkette (Cukier, 2005) verantwortlich, die durch eine Konformationsänderung von K354M (Bränden et al., 2001) oder T351 kontrolliert wird. Dies wird hier als der Raten limitierende Schritt mit der gemessenen Aktivierungsenergie angesehen und liegt daher über der in Wasser gefundenen.

Als Folge der Protonenaufnahme kommt es zu einer Umorientierung von Wassermolekülen, die eine Neukonfiguration von Wasserstoffbrückenbindungen zur Folge hat. Daher resultiert der beobachtete Isotopeneffekt im Wildtyp der Cytochrom *c* Oxidase. Im Ergebnis wird der E-Zustand erreicht (4.6(c)). Der Grund für die Beschränkung des Elektronentransfers auf Cu_A und Häm *a* kann entweder thermodynamischer oder kinetischer Natur sein. Die Mittelpunktspotentiale für Häm *a*₃ und Cu_B sind im E-Zustand nicht bekannt. Aufgrund der Nähe und Lokalisierung der drei Kofaktoren in der Mitte des Membrandielektrikums ist ein antikooperativer Effekt wahrscheinlich, wie er für Häm *a* und Häm *a*₃ gemessen wurde (Wilson et al., 1972). Die negative Ladung am Häm *a* wird durch Protonierung des Hydroxids am Cu_B ausgeglichen. Kinetisch könnte Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen ebenfalls kontrolliert werden, wenn der Elektronentransfer an eine Protonierungsreaktion gekoppelt wäre, wodurch die Transferrate durch den Protonierungszustand der Umgebung bestimmt wäre (Cukier, 1994; Mayer and Rhile, 2004).

Modell: Der K-Kanal im E→R-Übergang Elektrometrische Messungen haben die Beteiligung des K-Kanals am E→R-Übergang gezeigt (Ruitenbergh et al., 2002). Eine wesentliche Frage hinsichtlich des Mechanismus ist die nach der zweiten Protonierungsstelle, die über den K-Kanal erreicht wird. In Abbildung 4.6(d) wird vorgeschlagen, dass das zweite Proton oberhalb von K354 gebunden und in einem Cluster stabilisiert wird. Die Funktion dieser Reaktion ist die Stabilisierung der zweiten negativen Ladung im Proteininneren. Einher mit Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen geht eine Protonierungsreaktion, bei der unter der Beteiligung von E278 ein Proton über die Hämebene transloziert wird (Belevich et al., 2006). Die Akzeptorgruppe über der Hämebene ist bisher noch nicht identifiziert, aber es gibt Hinweise, dass das konservierte Argininpaar R473 & R474 eine Rolle hierbei spielt. So wurde eine verlangsamte Häm *a*₃-Reduktion in der homologen Mutante R473K in *Rhodobacter sphaeroides* mit Dithionit festgestellt (Mills et al., 2005), wobei in Simulationen hauptsächlich ein Effekt der Bildung einer Wasserkette zum Protonentransfer zwischen E278 und den Hämprotonaten beobachtet wurde (Seibold et al., 2005).

Als möglicher Akzeptor für das zu pumpende Proton wurde der Cu_B-Ligand H326 aus quantenmechanischen Berechnungen vorgeschlagen (Quenneville et al., 2004; Popović et al., 2005). Die Lokalisierung des Protons in der Nähe von Cu_B ermöglicht eine enge Kopplung zwischen der Protonenaufnahme durch den K-Kanal mit dem Austritt des zu pumpenden Protons auf einem Austrittsweg an H326 startend (Popović and Stuchebrukhov, 2005). Nach dem E→R-Übergang befindet sich demnach ein zusätzliches Proton, das über den K-Kanal stabilisiert wird.

4. Diskussion

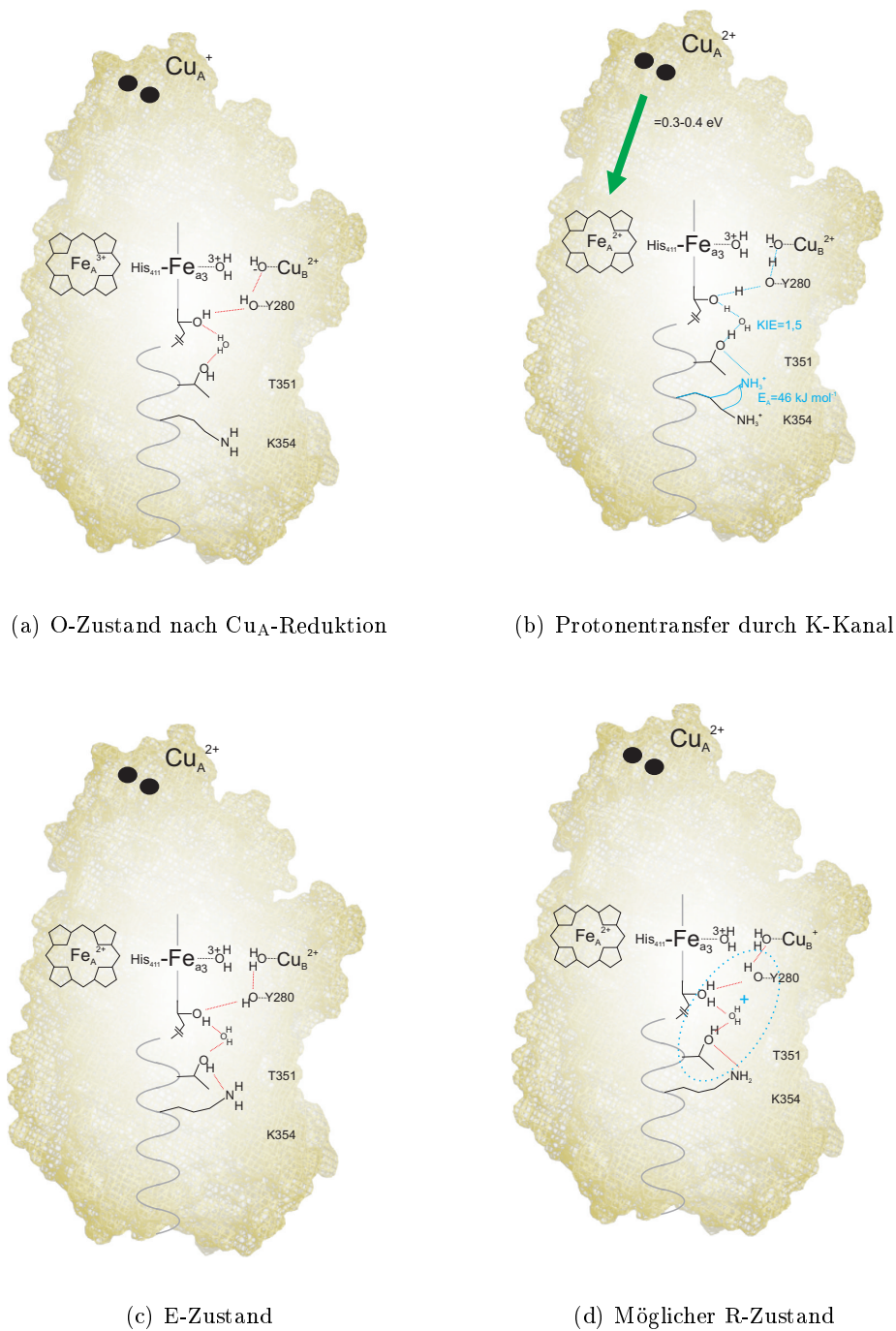


Abbildung 4.6.: Protonentransfer durch den K-Kanal in der reduktiven Phase (Details s. Text): (a) Mögliches Netz an Wasserstoffbrückenbindungen im K-Kanal. (b) Protonierung von K354 und Konformationsänderung der Seitenkette bestimmt die Aktivierungsbarriere. Umorientierung der Wasserstoffbrückenbindungen führt zu einem kleinen Isotopeneffekt. (c) E-Zustand mit Wasser an Cu_B als Folge der Protonierungsreaktion. (d) Zweiter Elektronentransfer führt zur Reduktion des binuklearen Zentrums, sowie Aufnahme eines zweiten Protons, das im K-Kanal delokalisiert stabilisiert wird.

Modell: Der K-Kanal bei der Sauerstoffspaltung und als Protonierungsstelle Die Anwesenheit eines zusätzlichen Protons im K-Kanal nach Aufnahme des zweiten Protons bekommt auch im nächsten Schritt, der Sauerstoffreduktion, eine wesentliche Bedeutung. So konnte wieder aus quantenmechanischen Berechnungen eine Erniedrigung der Aktivierungsenergie der Spaltung der Sauerstoffbindung bei Anwesenheit eines Protons auf der Hydroxylgruppe der Farnesylethylseitenkette von Häm a_3 als Ergebnis festgestellt werden, so dass diese im gemessenen, physiologischen Bereich lag (Blomberg et al., 2003). Der positive Einfluss einer Säuregruppe auf die Sauerstoffspaltung konnte auch an einfachen Modellsystemen nachgewiesen werden (Chang et al., 2003). Da der $A \rightarrow P_M$ -Übergang nicht mit einer Ladungsverschiebung durch den K-Kanal einhergeht (Jasaitis et al., 1999), müsste bei der Richtigkeit dieser Vorstellung das Proton schon im Kanal lokalisiert sein.

Das zusätzliche Proton ist jedoch nicht nur für den Übergangszustand der Sauerstoffspaltung von Bedeutung, sondern auch um das reduzierte Häm a_3 zu stabilisieren, das erst Sauerstoff binden kann. Der stabilisierende Einfluss von K354 auf den R-Zustand von Häm a_3 kann mit Hilfe der K354M-Mutante beobachtet werden. Die Mutante weist in ihrer isolierten Form einen beträchtlichen Anteil an reduziertem Häm a auf. Der Grund hierfür ist, dass eine weiterführende Reduktion nicht mehr möglich ist und der Zustand mit reduziertem Häm a für das Enzym wie eine Falle wirkt, in der sich die COX-Moleküle sammeln. Während das erste Proton noch langsam aufgenommen werden kann (vgl. auch die niedrigere Aktivierungsenergie für die Mutante im $O \rightarrow E$ -Übergang, Tabelle 3.1), findet dieser Transfer im nächsten Schritt nicht mehr statt, da die Protonierungsstelle weggefallen ist. Die Seitenkette des Lysinrestes stellt nicht nur die höchste Energiebarriere dar, sondern trägt auch beträchtlich bei der endergonischen Aufnahme einer positiven Ladung bei, die wie in Abbildung 4.6(d) vorgeschlagen in einem Cluster oberhalb von K354 „solvatisiert“ wird.

Der stabilisierende Effekt des Protons kann durch die Anwesenheit von Inhibitoren wie Stickstoffmonoxid (NO) umgangen werden. NO besitzt eine hohe Affinität für das reduzierte Häm a_3 (Giuffré et al., 1996) und in Anwesenheit von NO wird die verlangsamte Reduktion des binuklearen Zentrums in der K354M Mutante um einen Faktor ≥ 100 beschleunigt (Giuffré et al., 2002). Hier ermöglicht also die Bindungsenergie von NO eine Reduktion des binuklearen Zentrums. Das gleiche Prinzip lässt sich auch als Erklärung für die Bildung des MVCO-Enzyms und den Elektronenrückfluss nach Photolyse des CO heranziehen. Das binukleare Zentrum lässt sich auch ohne kompensierendes Proton durch CO reduzieren, wenn auch in geringerem Ausmaß (Jünemann et al., 1997). Wie NO übernimmt hier CO den stabilisierenden Einfluss. Das Proton, das bei der Reduktion des binuklearen Zentrums durch CO frei wird (s. Gl. 3.4 auf S. 44), kann nicht in dem Cluster aufgrund des Fehlens der Lysinseitenkette gehalten werden. Folglich ist bei Photolyse von CO keine Protonenabgabe über den K-Kanal zu beobachten (Sigurdson et al., 2002). Die Abwesenheit eines P_R -Zustandes bei der Reaktion mit Sauerstoff und des F' -Zustandes bei der Reaktion mit H_2O_2 folgt derselben Argumentation für die K354M Mutante: Bei Fehlen der Lysinseitenkette werden diese Zustände nicht mehr stabilisiert und das so entstandene Intermediat reagiert viel schneller mit einem weiteren Elektron, entweder von Häm a oder einem zweiten Peroxidmolekül.

Das konservierte Lysin findet sich nicht in der ba_3 -Oxidase aus *Thermus thermophilus*, dennoch erfolgt auch in diesem thermophilen Enzym Protonentransfer im $O \rightarrow E$ -Übergang. Abbildung 4.7 vergleicht die Struktur des K-Kanals der Oxidasen aus *Paracoccus denitrificans* und *Thermus thermophilus* (Ostermeier et al., 1997; Soulimane et al., 2000). Während

4. Diskussion

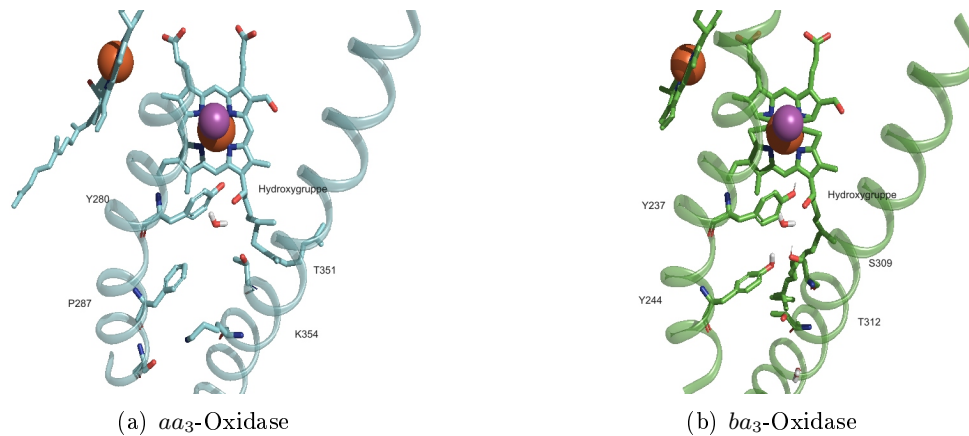


Abbildung 4.7.: Vergleich des K-Kanals aus der Oxidase von *Paracoccus denitrificans* (PDB 1AR1) (a) und von *Thermus thermophilus* (PDB 1EHK) (b). Die homologen Aminosäuren, die am Protonentransport beteiligt sind, sind in den beiden Strukturen bezeichnet. Als lila Kugel ist Cu_B mit dem dahinter liegenden Häm a_3 zu sehen.

die Hydroxylgruppe der Seitenkette von Häm a_3 und das Tyrosin am binuklearen Zentrum konserviert sind, finden sich Unterschiede bei den beiden anderen am Protonentransport beteiligten Aminosäuren. Aus dem Threonin T351 wird im thermophilen Enzym ein Serin S309 und das Lysin K354 wird zum Threonin T312. Für einen funktionellen Protonentransfer vom T312 zum S309 wurde hier für das bakterielle Enzym eine Konformationsänderung von der Seitenkette von K354 und eine Ausbildung einer Wasserkette vorgeschlagen, der die beobachtete Aktivierungsenergie zugeschrieben wurde. Die kürzere Seitenkette des T312 könnte hier eine ähnliche Funktion übernehmen, die die Ausbildung einer Protonen leitenden Struktur kontrollierte und zu einer vergleichbaren Aktivierungsenergie führte, wie es hier in den elektrometrischen Messungen beobachtet wurde. Hierbei könnte zusätzlich die Seitenkette von Y244, das im Enzym aus *Paracoccus denitrificans* ein Phenylalanin F287 entspricht, als Protonen leitendes Element mit seiner Hydroxygruppe am Phenylring eingreifen und somit die geringere konformationelle Reichweite des T312 ausgleichen.

4.1.4. Modell des katalytischen Zyklus und seine Implikationen

Zum Schluss soll das Modell des stabilisierenden Einflusses des Protonenclusters im K-Kanal in ein spekulatives Reaktionsmodell der Cytochrom *c* Oxidase eingebettet werden. Es folgt dem Prinzip der Elektroneutralität im Proteininneren mit niedriger Dielektrizitätskonstante, das zum Ladungsausgleich der Elektronen durch Aufnahme von Protonen führt. Dieses Prinzip ist in vielen Modellen angewendet worden und insbesondere von Rich et al. (1998) und Michel (1999) betont worden. Weiterhin ist Elektronentransfer von Häm *a* auf Häm a_3 an Protonentransfer ausgehend von E278 zur Pumpstelle oberhalb der Hämkofaktoren gekoppelt. Belevich et al. (2006) wiesen durch elektrometrische und spektroskopische Messungen diese Kopplung nach, die ebenfalls schon in vielen Modellen enthalten war. Der Protonenakzeptor oberhalb der Hämgruppen ist hier mit H326, einem Cu_B -Liganden, angegeben, wie es in DFT (*density functional*) Berechnungen gezeigt worden ist (Popović et al., 2005). Dies entspricht jedoch einer vereinfachten Darstellung, denn am Transfer des Protons und seiner Stabilisierung sind eine Reihe von Gruppen betei-

4.1. Die Cytochrom *c* Oxidase

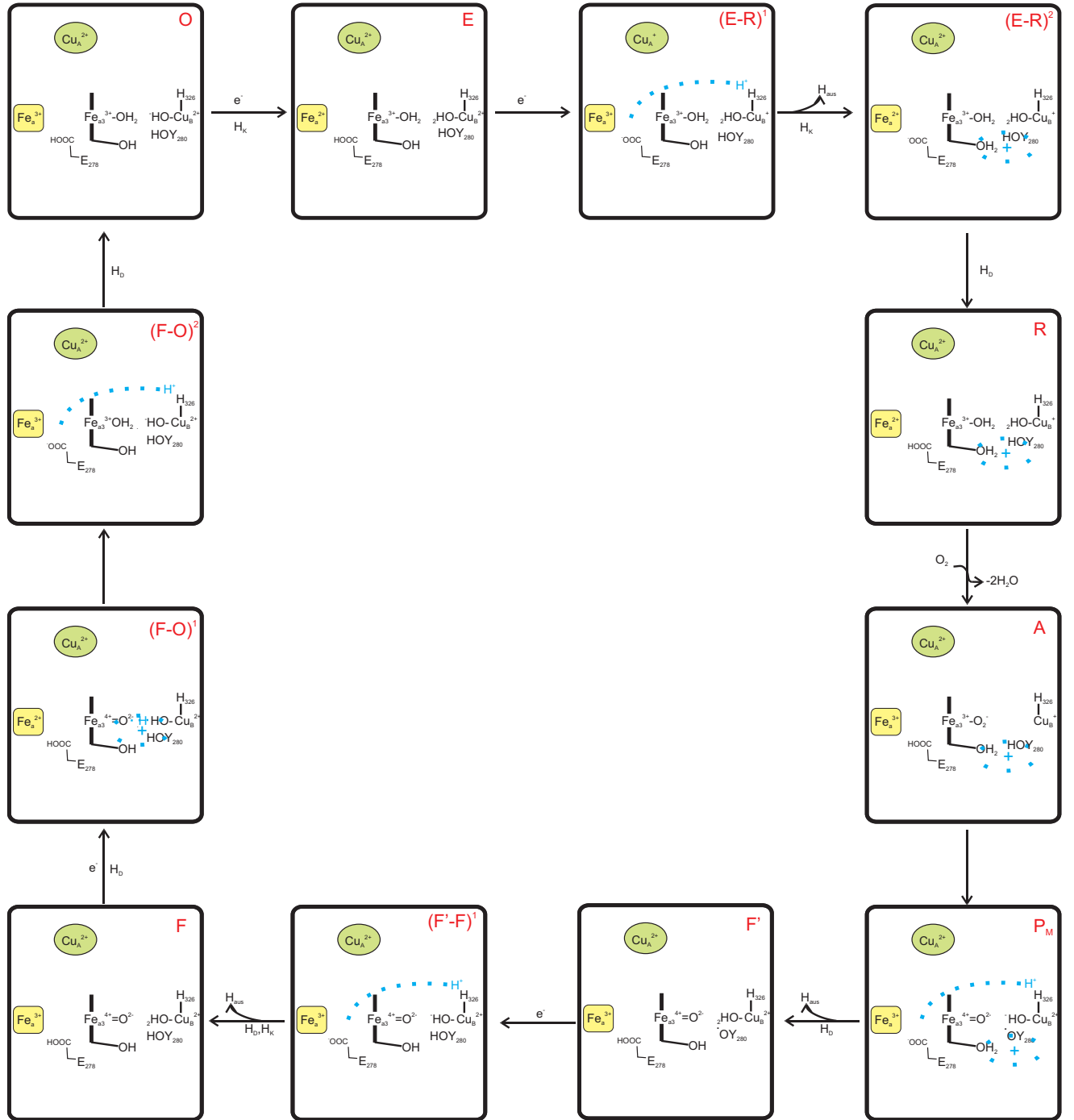


Abbildung 4.8.: Reaktionszyklus der Cytochrom *c* Oxidase unter Berücksichtigung der besonderen Rolle und des stabilisierenden Einflusses des K-Kanals. Die einzelnen Intermediate sind mit den üblichen Buchstaben benannt, einzelne Aminosäuren mit Bedeutung für den Zyklus sind angegeben. Die Hydroxygruppe der Farnesylethylseitenkette von Häm a_3 ist ebenso dargestellt wie die Carboxygruppe des Glutamates E278. Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen wird von Protonentransfer von E278 zu einer Pumpstelle begleitet (\cdots). Diese ist hier mit dem Cu_B -Liganden H326 angedeutet, kann aber mehrere Gruppen umfassen. Ebenso ist das Protonencluster oberhalb von K354 angezeigt (\cdots) mit dem Proton auf der Hydroxygruppe. Auch hier muss von einer Delokalisierung der Ladung ausgegangen werden. Einzelheiten zum Modell finden sich im Text.

ligt, wie in verschiedenen Studien schon nachgewiesen wurde: das konservierte Argininduo R473 & R474 (Mills et al., 2005; Puustinen and Wikström, 1999), die Propionatseitenketten der Häme (Behr et al., 1998, 2000), R54 (Kannt et al., 1999) oder W164 (Ribacka et al., 2005). Gemein ist diesen Gruppen eine starke elektrostatische Wechselwirkung untereinander (Kannt et al., 1998a), die essentiell für den Mechanismus der COX ist.

Reduktive Phase: Der O→E-Übergang wurde schon im obigen Abschnitt behandelt. Wichtig bleibt festzustellen, dass im E-Zustand das Elektron zwischen Cu_A und Häm *a* verteilt bleibt, während das aufgenommene Proton am Cu_B lokalisiert ist. Die Ladungstrennung in der Membranhorizontalen kann durch die polaren Hämgruppen, Wassermoleküle oder Proteindipole stabilisiert werden, was einer Erhöhung der effektiven Permittivität ϵ_p entspräche (Schutz and Warshel, 2001). Das zweite Elektron führt nach Aufnahme auf Cu_A zu einem antikooperativen Effekt mit Häm *a* zwischen diesen beiden reduzierten Kofaktoren. Durch das Absenken des Mittelpunktspotentials von Häm *a* kommt es zum Elektronentransfer ins binukleare Zentrum. Dabei kommt es zur transienten Deprotonierung von E278 mit Protonenabgabe zur Pumpstelle. Protonenaufnahme via den K-Kanal führt zur Ausstoßung des zu pumpenden Protons und der Bildung des Protonenclusters, der hauptsächlich über die zusätzliche negative Ladung am Cu_B stabilisiert wird. Elektronentransfer auf Häm *a* und Reprotonierung von E278 beenden den E→R-Übergang.

Im Unterschied zu vorherigen Modellen wird auch im R-Zustand das Elektron auf Häm *a* und nicht auf Häm *a*₃ vermutet. In Elektronenrückflusseexperimenten nach CO-Photolyse vom MVCO-Enzym ist ein beträchtlicher Elektronentransfer von Häm *a*₃ nach Häm *a* zu beobachten (Verkhovsky et al., 2001b), woraus sich zumindest ein ähnlich hohes Mittelpunktspotential für Häm *a* wie für Häm *a*₃ ableiten lässt. Die Bindung von Sauerstoff wirkt wie eine Elektronenfalle für den Elektronentransfer auf Häm *a*₃ (Intermediat A, s.u.). Die Wassermoleküle, die an die Kofaktoren des binuklearen Zentrums gebunden sind, müssen ebenfalls in diesem Schritt freigesetzt oder verschoben werden. Aufgrund ihrer langen Verweilzeit im binuklearen Zentrum in Molekulardynamikrechnungen wurde auch über ihre Rolle in der anschließenden Sauerstoffspaltung spekuliert (Zheng et al., 2003; Wikström et al., 2005). Dies steht auch im Einklang mit der oben erwähnten Rolle eines zusätzlichen Protons im binuklearen Zentrum, das die Aktivierungsbarriere für die Sauerstoffspaltung beträchtlich senkt (Blomberg et al., 2003).

Oxidative Phase: Ausgehend vom R-Zustand führt die Sauerstoffbindung zum Elektronentransfer nach Häm *a*₃, der wieder mit Deprotonierung von E278 verknüpft ist. Die anschließende Spaltung der Sauerstoffbindung erfolgt in einem Schritt, der zum Ferrylzustand am Häm *a*₃ und dem Tyrosinradikal am Y280 führt (für eine Diskussion des Radikals siehe Budiman et al., 2004). Der so gebildete P_M-Zustand ist sehr instabil mit einem zu pumpenden Proton an der Pumpstelle und einem deprotonierten E278. Die Deprotonierung von E278 oder eine große strukturelle Veränderung wurde auch aus FT-IR Differenzspektren am Wildtyp und der E278Q-Mutante geschlossen (Nyquist et al., 2003; Iwaki et al., 2004). Die Bildung P_M-Zustandes ist stark pH-abhängig und er ist nur bei hohem pH zu beobachten, denn Erniedrigung des pH-Wertes führt zur Reprotonierung der Säuregruppe von E278 und Freisetzung des gepumpten Protons (F'-Zustand). Der nächste Elektronentransfer führt zur Wiederherstellung des Y280 mit derselben Abfolge: Reduktion von Häm *a* mit Aufnahme des kompensierenden Protons, Transfer ins binukleare Zentrum (auf das Tyrosinradikal) mit Protonentransfer von E278 zur Pumpstelle und Reprotonierung von E278. Hier kann es auch zum ausschließlichen Protonentransfer via des D-Kanals kom-

men, d.h. sowohl chemisches als auch gepumptes Proton werden über den D-Kanal aufgenommen. Da die K-Kanalmutanten weiterhin Peroxidaseaktivität besitzen und somit den oxidativen Teilzyklus durchlaufen können, muss es einen Mechanismus geben, der die Protonen nach E278 Richtung Pumpstelle und binukleares Zentrum verteilt. Hierfür wurde die transiente Ausbildung von Wasserketten zu den unterschiedlichen Bestimmungsorten vorgeschlagen, die unter der Kontrolle des elektrischen Feldes zwischen den Hämen steht (Wikström et al., 2003). Der F→O-Übergang verläuft in ähnlicher Weise und führt zur Reduktion des Ferrylzustandes und anschließender Protonierung.

Zusammenfassung: Die Cytochrom *c* Oxidase besitzt ein einzigartiges Arrangement ihrer Kofaktoren, die ihr ihre Funktionalität ermöglichen:

- Durch drei Redoxkofaktoren in der Mitte des Membrandielektrikums können Ladungstransporte an unterschiedlichen Stellen kompensiert werden: So wird die Reduktion von Häm *a* am binuklearen Zentrum mit einer positiven Ladung ausgeglichen, die an Cu_B oder im K-Kanal lokalisiert ist.
- Der K-Kanal stabilisiert negative Ladung und dient während der Sauerstoffchemie als Protonenreservoir für eine schnelle Spaltung der Sauerstoffbindung. Wahrscheinlich verweilt dieses Proton im R-Zustand nicht auf der Hydroxylgruppe der Farnesylethylseitenkette von Häm *a*₃, dessen pK_s-Wert zu hoch wäre, sondern befindet sich in dem vorgeschlagenen Cluster. Elektronentransfer führt zur Generierung von Intermediaten mit formal erniedrigtem pK_s-Wert, was zur anschließenden Protonierung führt. Die Energie der Sauerstoffreduktion wird in Zuständen mit hohem Mittelpunktpotential gespeichert, wovon das cuprische Cu_B eines ist (E→R-Übergang). Wie eine Kurzschlussreaktion eines Protons in diesem Cluster vermieden werden kann, ist bisher unklar.
- Ein wichtiger Punkt ist die starke Kopplung von Elektronentransfer zwischen den beiden Hämen mit Protonentransfer von E278 zur Pumpstelle, für die es verschiedene Erklärungsmuster gibt: Der Elektronentransferrate zwischen den beiden Hämgruppen lässt sich mit einem nichtadiabatischen Elektronentransfer (s. S.97) beschreiben. Die aufgrund der geringen Distanz zu erwartende Transferrate wurde auch experimentell im reversen Prozess bestätigt (Pilet et al., 2004) und die Reorganisationsenergie für diesen Prozess mit $\lambda = 0,2 \text{ eV}$ bestimmt (Jasaitis et al., 2005). Der hieran gekoppelte Protonentransfer kontrolliert die Transferrate, so dass sie insgesamt um Größenordnungen langsamer verläuft. So könnte wie vorgeschlagen (Siegbahn et al., 2003) Reduktion von Häm *a*₃ mit der Protonierung einer Propionatseitenkette von Häm *a*₃ einhergehen. In der Literatur sind verschiedene Formen der Kopplung diskutiert worden (Cukier and Nocera, 1998; Cherepanov et al., 2001; Hammes-Schiffer, 2001), die die Rolle der Medium- oder Proteinrelaxation als starken Einfluss auf die Kinetik betonen, und es wird interessant in der Zukunft sein, weitere Faktoren für die COX zu bestimmen.
- Medvedev et al. (2005) beleuchteten das Problem von Kurzschlussreaktionen im Zusammenhang mit einem ähnlichen Modell und verdeutlichten die Möglichkeit einer kinetischen Kontrolle über den Pumpmechanismus. Was hier als strenge Kopplung zwischen dem Elektronentransfer zwischen den Hämen und der Protonenbewegung bezeichnet wurde, schlägt sich kinetisch in der Forderung nieder, dass die Pumpstelle

4. Diskussion

beladen werden muss, bevor Protoneneintritt ins binukleare Zentrum (chemisches Proton) stattfindet. Für das zu pumpende Proton bedeutet dies, dass die höchste Energiebarriere nicht auf dem Reaktionsweg zur Pumpstelle liegen kann, sondern nachgeschaltet sein muss, wie z.B. der Austritt des Protons aus dem Protein (Gutman and Nachliel, 1990).

Aus elektrometrischen und pH-Messungen kamen Verkhovsky et al. (1999b) zu dem Schluss, dass sich je zwei gepumpte Protonen auf den reduktiven und den oxidativen Teilzyklus verteilen. Diese Interpretation wurde später dahin weiterentwickelt, dass nach vollständiger Reduktion und Oxidation der COX im anschließenden reduktiven Teil je ein Proton im O→E-Übergang und im E→R-Übergang gepumpt wird (Bloch et al., 2004). Der Startzustand für diese Messungen (Red-CO) ist jedoch artifiziell und führt zu einer veränderten Protonenaufnahme. Im Enzym aus *Paracoccus denitrificans* werden bei anaerober Reduktion des oxidierten Zustandes ~ 3 Protonen aufgenommen (Forte et al., 2004). Mit dem Hydroxidion und dem Cluster im K-Kanal – die K-Kanalmutante K354M nimmt tatsächlich ~ 1 Proton weniger auf – sind zwei Protonenakzeptoren identifiziert. Die dritte Protonenaufnahme durch die exogene Reduktion könnte zu einer unterschiedlichen Elektronenverteilung im anschließenden reduktiven Teilzyklus führen, so dass es hier schon im O→E-Übergang zu einem Elektronentransfer ins binukleare Zentrum mit gekoppeltem Protonenpumpen kommt. Die Betonung liegt hier jedoch auf der Tatsache, dass durch die anaerobe Reduktion ein hochenergetischer Zustand geschaffen wird, der nach Oxidation mit Sauerstoff instabiler Natur ist. Formal entspricht der oxidierte Zustand der gepulsten Form. Für das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* wurde hier beobachtet, dass die so gewonnene Spezies in den ursprünglich oxidierten Zustand über der Zeit relaxiert. Über die Natur dieses Zustandes kann nur spekuliert werden, auch ob sie im physiologischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase vorkommt und eine Rolle spielt.

4.1.5. Der D-Kanal und die N131D-Mutante

Einen Hinweis auf die Kopplung von Elektronen- und Protonentransfer sollten die elektrometrischen Messungen an der N131D-Mutante im D-Kanal geben, die normale Sauerstoffreduktion bei gleichzeitiger Abwesenheit von Protonenpumpen aufweist. Hier verhielt sich diese Variante jedoch wie die klassische D-Kanalmutante D124N, die zu einer beträchtlichen Blockade des Protonenkanals führt (6% Restaktivität). Insbesondere im F→O-Übergang, in dem sowohl das chemische Proton als auch das gepumpte Proton über den D-Kanal aufgenommen werden, sollte eine Protonenphase in den Spannungssignalen sichtbar sein. Für das Enzym aus *Rhodobacter sphaeroides* wurde diese auch beobachtet (Siletsky et al., 2004), während hier das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* nur eine schnelle Phase zeigte.

Eine einfache Erklärung besteht in der Darstellung des F-Zustandes mit H_2O_2 . Hierbei werden im F-Zustand drei Protonen aufgenommen (Konstantinov et al., 1992; Mitchell et al., 1992b). Das vierte Proton der zwei H_2O_2 -Moleküle wird freigesetzt. Bei den Messungen hier handelt es sich um Enzyme aus zwei verschiedenen Bakterien, und sie wurden bei leicht unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt (pH 7,4 für *Paracoccus denitrificans* vs. pH 8,0). Aufgrund dieser Unterschiede kann es zu einer Zurückhaltung des vierten Protons im binuklearen Zentrum kommen, so dass hier im F→O-Übergang tatsächlich keine zusätzliche Phase zu beobachten wäre. Alternativ kann auch ein schneller Protonentransfer in das binukleare Zentrum nicht ausgeschlossen werden. Im Enzym aus *Rhodobacter sphaeroides*

wurde eine im Vergleich zum Wiltyp beschleunigte Reoxidation von Häm *a* beobachtet, die der Zeitkonstante der schnellen elektrometrischen Phase entsprach. Da Elektronentransfer in das binukleare Zentrum an Protonentransfer auch in der Mutante im F→O-Übergang gekoppelt ist (normale Sauerstoffreduktion), liegt vielleicht ein Grund für das entkoppelnde Verhalten in einem beschleunigten Protonentransfer in das binukleare Zentrum. Der Effekt der Mutation wäre kinetischer Natur: Für eine Entkopplung muss der Protonentransfer ins binukleare Zentrum schneller erfolgen als der des zu pumpenden Protons.

Namslauer et al. (2003) schlugen als Grund eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen N131D und E278 vor, die zu einer verlangsamten Protonenabgabe an die Pumpstelle aufgrund einer apparenten pK_s -Erhöhung führt. Elektrostatische Berechnungen von Olkhova et al. (2005) wiesen hingegen eine sehr geringe Coulombwechselwirkung zwischen diesen beiden Aminosäureresten nach. Viel größer war diese hingegen mit dem Eingang des D-Kanals wie dem Aspartat D124. Der Effekt der Mutante liegt also viel eher in der Aufnahme von Protonen und der Ausrichtung von Wassermolekülen für einen effizienten Protonentransfer. Damit in Einklang steht auch der Vorschlag von Olsson et al. (2005), die aus theoretischen Berechnungen einen konzertierten Protonentransfer über E278 vorschlugen. Bei Störung wie in der N131D Mutante kann dieser nicht erfolgreich verlaufen, Protonentransfer zur Pumpstelle findet nicht statt. Xu and Voth (2005) wiesen in Simulationen eine mögliche Aufenthaltsstelle von Protonen im D-Kanal zwischen E278 und N131 (S192 & S192 in *Paracoccus denitrificans*) in Abhängigkeit der Protonierungszustände dieser beiden Aminosäuren nach. So konnte ein Proton in diese zweite Bindungsstelle bei protoniertem E278 transportiert werden. Ein mögliches Szenario für die Entkopplung dieser wichtigen Mutante beinhaltet also die Abwesenheit eines möglichen konzertierten Protonentransfers von D124 über E278 zur Pumpstelle aufgrund der Störung in der Protonentransferkette (kinetischer Defekt), während Protonentransfer zu einer zweiten Stelle weiterhin möglich ist und somit ein chemisches Proton in für einen intakten Zyklus der Sauerstoffchemie bereit gestellt werden kann. Die Erklärung liefert auch einen ersten Einblick, warum eine Mutation am Eingang des D-Kanals (D124N) einen so dramatischen Phänotyp mit einer fast kompletten Inaktivierung aufweist. Für den D-Kanal ist die elektrostatische und energetische Beschaffenheit also schon eingangs von großer Wichtigkeit, wo der K-Kanal noch eine größere Robustheit aufweist. Experimentell wurde dies auch in einer sehr informativen Untersuchung von Bränden et al. (2006) an der Doppelmutante D124N/N131D bestätigt. Diese ist wieder in der Lage, wenn auch vermindert, Protonen über der Membran zu pumpen. Die ungünstige Wechselwirkung zwischen den Positionen 124 und 131, die in den Einzelmutanten vorliegen, kann hierdurch also zum Teil ausgeglichen werden. Beide Aminosäurereste besitzen bei unterschiedlicher Lokalisation im D-Kanal einen großen Einfluss auf den Protonentransport über E278.

4.2. Die Quinol-Fumarat Reduktase

Ziel dieser Arbeit war die schnelle Aktivierung der QFR mit Hilfe eines geschützten Substrates, *caged* Fumarat, das nach Lichtanregung zur Freisetzung von Fumarat führt. Während das Substrat erfolgreich synthetisiert werden konnte, machte die Photochemie bei der Freisetzungswellenlänge eine funktionale Untersuchung leider unmöglich. Bei 308 nm besitzen einige chromophore Gruppen eine beträchtliche Absorption, die Eisen-Schwefel-Zentren, die Hämgruppen, das FAD oder die verwendeten Menaquinole. Wie in den spektroskopischen Messungen gezeigt, führt diese Komposition nicht nur zur transienten, sondern auch stationären Photoreduktion der QFR, die die zu beobachtenden Signale überlagert (s. Abb.3.25 auf S.64). Zwar konnten in den zeitaufgelösten spektroskopischen Messungen die Artefakte minimiert werden, indem Dithionit als exogenes, artifizielles Reduktionsmittel eingesetzt wurde, in den elektrometrischen Messungen waren jedoch die Spannungsartefakte an der Membran weiterhin zu groß (Abb.3.27 auf S.66). Diese Artefakte sind stark wellenlängenabhängig und nehmen im roten Spektralbereich deutlich ab: So konnte durch Verwendung von Licht der Wellenlänge von 345 nm die Größe der betrachteten Signale um die Hälfte gesenkt werden. Bei 450 nm waren schon vernachlässigbar kleine Artefakte vorhanden, die eine Untersuchung zuließen. Hier findet allerdings keine Photolyse des Substrates mehr statt. Aus dieser Wellenlängenabhängigkeit kann gefolgert werden, dass weder die Hämgruppen noch das FAD die ursprünglich absorbierende Gruppe ist. Möglich erscheint daher eine Beteiligung entweder der verwendeten Quinolsubstrate oder der Eisen-Schwefel-Zentren der QFR. Letztere besitzen eine breite *charge-transfer* Bande vom Eisen auf die koordinierenden Cysteinliganden, $\text{Fe} \rightarrow \text{S}$, die sich mit zunehmender Extinktion vom sichtbaren in den ultravioletten Bereich erstreckt (Beinert, 2002).

Um die Artefakte der photochemischen Reaktionen zu vermeiden, sind verschiedene Strategien denkbar, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden sind, für eine Anknüpfung an die kinetischen Untersuchungen der QFR jedoch hilfreich sein könnten. Alternativ zu den Menaquinolen ließe sich die QFR zumindest auch teilweise mit einem Überschuss an Ubiquinol reduzieren. Aufgrund der selektiven Anregung durch die Fumaratfreisetzung wäre eine Synchronisierung einer Reaktion zu erreichen. Nachteilig wirken sich hier jedoch die ungünstigen Mittelpunktspotentiale der Substrate aus, $E'_0(\text{Fumarat/Succinat})=30 \text{ mV}$ und $E'_0(\text{UQH}_2/\text{UQ})=80 \text{ mV}$ (Lemma et al., 1991). Weiterhin könnte eine geschützte Verbindung, die sich im sichtbaren Bereich photolysieren ließe, die Problematik der Photochemie umgehen. Kürzlich wurde eine neue Schutzgruppe, ein Coumarinderivat, erfolgreich in biologischen Studien für die Freisetzung von cyclischen Nukleotiden eingesetzt (Hagen et al., 2001, 2003). Diese Verbindungen zeichneten sich durch eine schnelle und effiziente Freisetzung aus, und vor allem konnten sie bei 400 nm photolysiert werden. Die Coumaringruppe kann auch für die Kopplung an Säuregruppen verwendet werden. Für Glutamat konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung mit einer Zeitkonstante von 3 μs bei einer Quanteneffizienz von 0,11 stattfindet (Shembekar et al., 2005). Zusammen mit einer hohen Extinktion im sichtbaren Bereich ($\sim 12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 400 nm) ist diese Schutzgruppe ein geeigneter Kandidat für die Verwendung von Fumarat in kinetischen Studien an der QFR.

Abbildung 4.9 zeigt in einem Synthesevorschlag die mögliche Verwendung der neuen DECM-Schutzgruppe. Alle Edukte sind leicht zugänglich und die Chemie ist der für das hier synthetisierte *caged* Fumarat sehr ähnlich. Mit seinen Eigenschaften, der schnellen Freisetzung im sichtbaren Bereich, wäre es für kinetische Studien an der QFR geeignet,

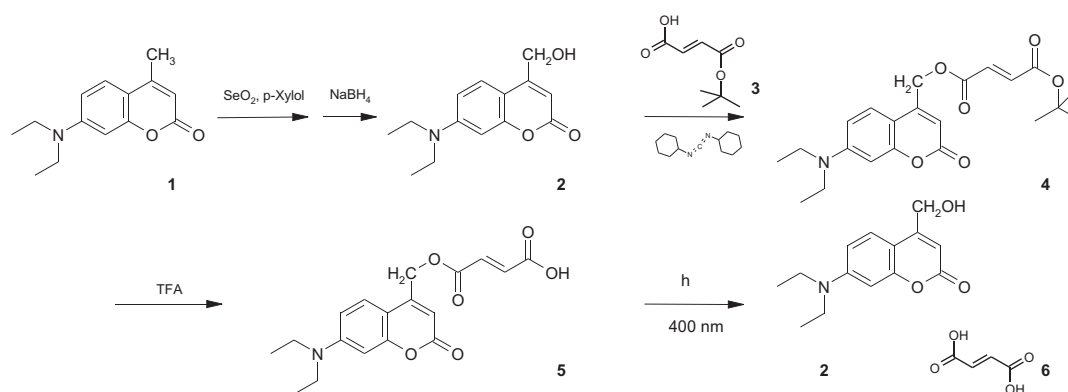


Abbildung 4.9.: Synthesevorschlag für ein neues *caged* Fumarat: 7-N,N-Diethylamino-4-Methyl-Coumarin (DECM, **1**) wird zunächst zweistufig an der Methylseitenkette funktionalisiert durch Oxidation mit Selendioxid und Reduktion durch Borhydrid. Der so entstandene Alkohol (**2**) wird mit *tert*-Butylfumarsäure, einem Zwischenprodukt der Synthese von *caged* Fumarat (s. Anhang A.1 auf S.155), mit Hilfe des Kopplungsreagenzes Dicyclohexylcarbodiimid verestert, und es wird das Produkt mit der *tert*-Butylschutzgruppe erhalten (**3**). Nach Abspaltung der Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) ist das gewünschte *caged* Fumarat² dargestellt ((7-N,N-Diethylamino-coumarin-4-yl)-Methylfumarsäure, **5**). Photolyse bei 400 nm führt zur Freisetzung des Substrates Fumarat **6**.

insbesondere da nicht geklärt ist, ob die Freisetzungsrates des Fumarates aus der hier verwendeten geschützten Verbindung ausreichend ist, um transiente Bewegungen innerhalb der QFR zu detektieren.

4.3. Der bc_1 -Komplex

Bezüglich kinetischer Messungen am bc_1 -Komplex wurden hier die ersten Grundlagen für die Etablierung eines Messsystems geschaffen. Die erfolgreiche Synthese von Ru_2Q ermöglicht nun schnelle transiente Messungen an der *BLM*, wie an der Cytochrom *c* Oxidase als bekanntes Modellsystem gezeigt. Die ersten Spannungssignale konnten schon erhalten werden, allerdings handelt es sich, wie schon erwähnt, um vorläufige Ergebnisse. Insbesondere die Adsorption der hydrophoben Substanzen, Quinole und Inhibitoren, an die Messküvette stellen experimentelle Probleme dar, die noch weiter zu erörtern sind. Von großer Bedeutung für die elektrometrischen Messungen stellen sich noch zwei weitere Punkte heraus, die noch im Einzelnen diskutiert werden sollen, da sie wesentlichen Einfluss auf die beobachteten Signale und ihre Interpretation besitzen: der Ausgangszustand des bc_1 -Komplexes und die Diffusion der Quinole. Bisher ist eine Zuordnung für die elektrogenen Vorgänge unter den Bedingungen der Photooxidation oder Photoreduktion mit organometallischen Rutheniumkomplexen nicht erfolgt. Die meisten bekannten Daten basieren auf Messungen an Chromatophoren, in denen die Reduktions- und Oxidationsäquivalente von licht-aktivierten Reaktionszentren bereitgestellt werden. Hinsichtlich der elektrogenen Signale bestehen Unterschiede in der Literatur. In Klishin et al. (2002) ist die Reduktion von Häm b_H nicht elektrogen und schneller als die Rereduktion von Häm c_1 . Ladungstransfer wird durch die Oxidation von Häm b_H kontrolliert, die daraufhin zur Freisetzung der gebunde-

nen Protonen aus der Quinoloxidation, der Bewegung des Rieske-Proteins zum Cytochrom c_1 und der Aufnahme von Protonen an der Q_i -Bindungsstelle einhergehend mit der Reduktion des Quinons führt (Mulkidjanian, 2005). Dieser Mechanismus wird durch die Bindung von Antimycin in der Q_i -Bindungsstelle außer Kraft gesetzt. Dagegen beobachteten Crofts et al. (2003) eine elektrogene b_H -Reduktion. Die unterschiedlichen Raten für Cytochrom c_1 -Rereduktion und b_H -Reduktion waren in diesem Modell nicht Ausdruck einer Kontrolle der Q_i -Bindungsstelle über die Vorgänge an der Q_o -Bindungsstelle, sondern eine Folge der verschiedenen Equilibria zwischen den Kofaktoren und den Bindungsseiten des Rieske-Proteins. Dieser Mechanismus beansprucht nicht die Bedingung einer z.B. durch die Q_i -Bindungsstelle kontrollierten Freisetzung des Rieske-Proteins (s.a. Crofts et al., 2006). Elektrometrische Messungen mit höherer Zeitauflösung durch die Verwendung der Rutheniumkomplexe können sicher zur Diskriminierung der verschiedenen Phasen beitragen.

Ausgangszustand des bc_1 -Komplexes Nach Rekonstitution des bc_1 -Komplex in Proteoliposomen liegt Cytochrom c_1 und wahrscheinlich auch $[2Fe-2S]$ teilweise reduziert vor. Für Photoreduktionsexperimente ist daher die Anwesenheit von Ferricyanid unerlässlich. Schwieriger gestaltet sich das Einstellen des Ausgangszustandes für die Photooxidationsmessungen. Neben der möglichen Anwesenheit eines Semiquinons in der Q_i -Bindungsstelle, kann es auch zu einer Fraktion von Molekülen mit reduziertem Cytochrom c_1 und oxidiertem $[2Fe-2S]$ und einer Fraktion kommen, bei der beide Zentren reduziert vorliegen (s. Abb. 4.10). Die Rereduktion von Cytochrom c_1 kann hierbei in zwei unterschiedlich schnellen Phasen erfolgen, wie es auch spektroskopisch zu beobachten ist (Sadoski et al., 2000). Erschwerend kommt hinzu, dass bei der Verwendung von Ru_2Q neben der Oxidationsreaktion gleichzeitig auch Reduktion erfolgen kann in Abhängigkeit der Fraktion an oxidiertem Cytochrom c_1 . Aus den spektroskopischen Messungen mit DBH_2 wurde ein Reduktionsgrad von $\sim 70\%$ für Cytochrom c_1 bestimmt.

Die Bedeutung eines kontrollierten und definierten Ausgangszustandes soll anhand von Abbildung 4.10 beleuchtet werden. Bei einem hohen Reduktionspotential durch ein großes Quinol/Quinon-Verhältnis liegen der Eisen-Schwefel-Cluster und Cytochrom c_1 zunehmend reduziert vor. Dabei wird das Rieske-Protein in den Kristallstrukturen vorzugsweise in der Konformation an Cytochrom b gefunden (Yu et al., 2002). In EPR spektroskopischen Messungen ist ein indikatives Signal für eine Interaktion zwischen dem gebundenen Quinon und dem Eisen-Schwefel-Cluster sichtbar (Darrouzet et al., 2002). Photooxidation von Cytochrom c_1 durch den aktivierten Ru_2Q führt je nach Ausgangslage zu verschiedenen Vorgängen. Rereduktion erfolgt durch den Eisen-Schwefel-Cluster, ein Vorgang, der schnell einsetzt ($\tau \approx 15\text{-}20\text{ }\mu\text{s}$, Engstrom et al., 2002). Der Eisen-Schwefel-Cluster selbst kann ebenfalls in verschiedenen Populationen vorliegen, was zu unterschiedlichen elektrogenen Vorgängen führt:

1. Das Rieske-Protein in der ungebundenen oder der Cytochrom c -Position wird sein Elektron schnell auf Häm c_1 übertragen und anschließend durch die Quinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle wieder reduziert. Der erste Vorgang ist unter Umständen elektrogen, da er die Umkehr der Photoreduktion darstellt, die ein kleines Signal erbrachte (s. Abb. 3.37(a) auf S.78). Der zweite Prozess hingegen ist sicher elektrogen und kann durch Antimycin inhibiert werden.
2. Ist das Rieske-Protein nach der Photooxidation an der Cytochrom b -Seite gebunden und reduziert, führt dies ebenfalls zu einer schnellen Rereduktion des Cytochrom c_1 .

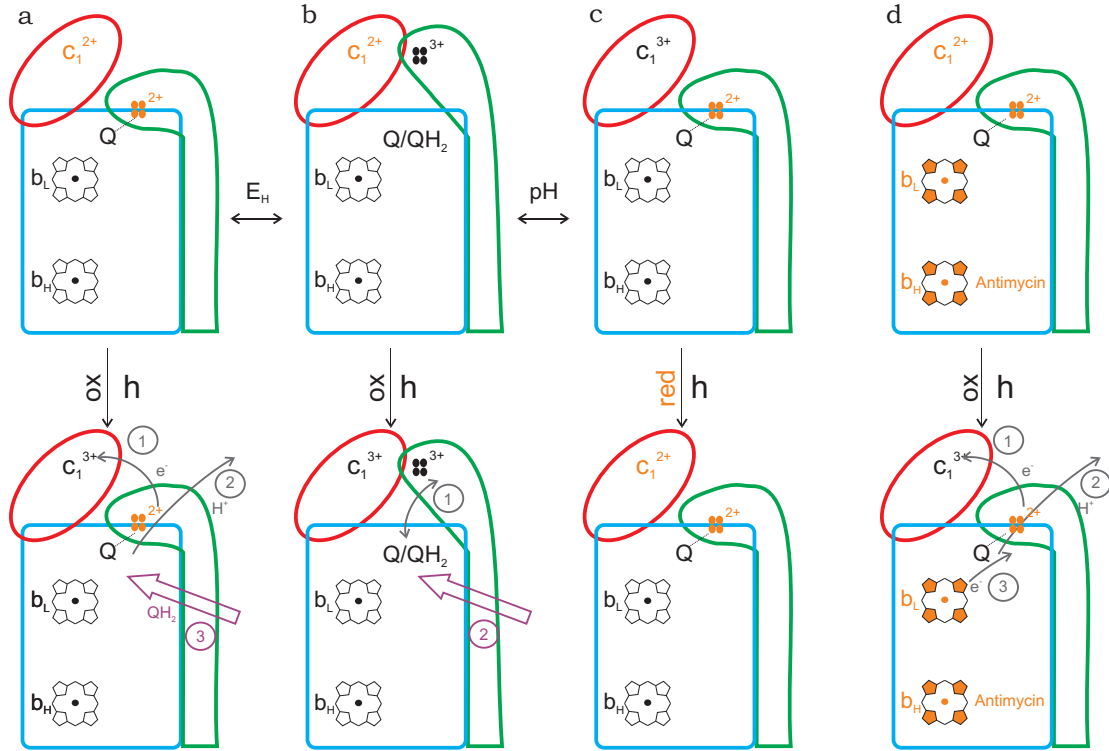


Abbildung 4.10.: Nach Zugabe von DBH_2 kann der bc_1 -Komplex in verschiedenen Ausgangszuständen vorliegen. Reduzierte Kofaktoren sind orange, oxidierte schwarz. Bei Anwesenheit von Quinon liegen die b -Häme von Cytochrom b (blauer Rand) oxidiert vor. Der reduzierte $[2Fe_2S]$ -Cluster des Rieske-Proteins (grüner Rand) weist eine Interaktion mit dem oxidierten Quinon in der Q_o -Bindungsstelle auf (—). Die Fraktion an reduziertem Cytochrom c_1 (roter Rand) und $[2Fe_2S]$ -Cluster (a) ist vom Reduktionspotential abhängig (E_H), d.h. dem Verhältnis von Quinol zu Quinon. In der einfach reduzierten Spezies (b oder c) kann die Verteilung des Elektrons zwischen diesen beiden Kofaktoren durch den pH-Wert moduliert werden, denn das Mittelpunkt-potential des Rieske-Proteins ist pH abhängig. Zugabe von Antimycin (d) blockiert die Oxidation der b -Häme, die somit ebenfalls reduziert vorliegen. In (a) führt die Photooxidation durch Ru_2Q zur Rereduktion von Cytochrom c_1 durch das Rieske-Protein (1). Die Lösung des Rieske-Proteins von der Cytochrom b -Seite wird eventuell von der Freisetzung von Protonen begleitet (2), beide Prozesse verlaufen schnell (Mikrosekundenphase). Da 2 stärker zur Ladungsverschiebung als 1 beiträgt, besitzt auch in den Photooxidationsexperimenten die schnelle Phase ein positives Vorzeichen wie in der Photoreduktion. In der langsameren Phase (3) findet die Quinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle statt, die Elektronentransfer auf die b -Häme und das $[2Fe_2S]$ -Cluster nach sich zieht. Die Quinolreduktion in der Q_i -Bindungsstelle ist mit Protonentransfer verbunden. Ausgehend von (b) sind die beiden schnellen Prozesse nicht sichtbar. Vor der Rereduktion von Häm c_1 muss das Rieske-Protein reduziert werden (1), so dass nur die langsame Phase der Quinoloxidation zu sehen ist (2). Bei einem oxidierten Cytochrom c_1 (c) finden keine elektrogenen Vorgänge statt, da letztlich nur ein Elektronentransfer auf Cytochrom c_1 von Ru_2Q erfolgen kann. Ein weiterer Transfer auf das reduzierte Rieske-Protein kann nicht stattfinden. Die Situation wäre bei einem vollständig oxidierten bc_1 -Komplex unterschiedlich, da hier zusätzlich der $[2Fe_2S]$ -Cluster reduziert werden kann und somit das Signal der Photoreduktion zu beobachten wäre. Wird der bc_1 -Komplex zuvor durch Antimycin inhibiert (d), können noch die schnellen Prozesse stattfinden (1 und 2). Sind die b -Häme noch nicht vollständig reduziert, kann es auch zu einem Elektronentransfer durch die Quinoloxidation kommen (3).

4. Diskussion

Dieser Vorgang kann ebenfalls elektrogen sein, da er mit einer Freisetzung der gebundenen Protonen, welche noch aus der vorhergehenden Quinoloxidation stammen, oder einer Relaxation des Mechanismus', der zuvor zur elektrischen Kompensation des Elektronentransfers zwischen den Hämgruppen führte, einhergehen könnte (Mulkidjanian, 2005). Dies stellt einen kritischen Punkt dar, der den Widerspruch aufheben kann, warum auch in den Photooxidationsexperimenten eine positive Spannung unabhängig von der Quinoloxidation über der Membran aufgebaut wird, also einem Elektroneneinstrom oder einem Protonenausstrom, wie er auch in den Photo-reduktionsexperimenten stattfindet. So kann erklärt werden, dass es in der Betrachtung zweier Teilprozesse im Elektronentransfer zwischen dem Eisen-Schwefel-Cluster und Häm c_1 sowohl in der Vorwärts- als auch in der Rückwärtsrichtung zu einer Ladungsverschiebung in dieselbe Richtung kommt.

3. Liegt das Rieske-Protein bei Photooxidation oxidiert vor, ist eine Quinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle zwingend für einen weiteren Elektronentransfer auf Häm c_1 . Da diese als Raten limitierende Reaktion deutlich langsamer als die ersten beiden Reaktionen mit reduziertem Rieske-Protein im Ausgangszustand stattfindet (Sadoski et al., 2000), kann sie deutlich separiert werden.

Der Ausgangszustand mit seiner Komposition diverser Populationen kann zu einer Vielzahl von kinetischen Phasen führen. Daher wird die Kontrolle eines definierten Ausgangszustandes für die Interpretation der einzelnen Prozesse unerlässlich sein. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf einzelne Phasen wird bei der Zuordnung dieser Phasen helfen: So lässt sich die Elektronenverteilung zwischen Häm c_1 und dem Eisen-Schwefel-Zentrum durch die Wahl des pH-Wertes kontrollieren (Punkt 2 & 3), das Ausmaß der Reduktion durch verschiedene Quinole, Menaquinole oder das Verhältnis der reduzierten zu oxidierten Form (Punkt 1) und die Reaktionen an der Q_o -Bindungsstelle und der Q_i -Bindungsstelle durch eine erfolgreiche Inhibition sowohl mit Stigmatellin als auch Antimycin.

Der Raten limitierende Schritt in den BLM-Experimenten Man kann eine Abschätzung versuchen, wie die effektive Quinolkonzentration in den Proteoliposomen die Bindungsrate unter der Bedingung einer diffusionskontrollierten Reaktion beeinflusst. Für verschiedene Lipidschichten wurden laterale Diffusionskonstanten von $\sim 1\text{--}4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ für Quinole gemessen (Chazotte and Hackenbrock, 1988; Marchal et al., 1998). Dabei waren diese nicht nur von der Lipidumgebung, sondern auch von der Kettenlänge des Quinols abhängig: Mit zunehmender Länge wurden erwartungsgemäß auch die Diffusionskonstanten kleiner. Bei einer Konzentration von $40 \mu\text{M}$ in der lipidischen Phase erhält man mit Hilfe der Einstein-Smoluchowski Gleichung eine Zeitkonstante von $\sim 500 \mu\text{s}$. Dieser Wert stellt eine obere Grenze dar, da die geometrischen Gegebenheiten der Liposomen nicht berücksichtigt wurden, sondern die Quinole als gleichverteilt im Lipidraum angesehen wurden. Wichtig jedoch ist die Tatsache, dass die Diffusionszeit schnell ein Faktor bei der Bestimmung des Raten limitierenden Schrittes werden kann. Insbesondere da aufgrund der Hydrophobizität des Teflons wohl eine Konkurrenzfläche für die Bindung der Quinole anwesend ist und wie beobachtet die Kontrolle der Quinolkonzentration sich als experimentelles Problem herausstellte. Einen Einfluss der Quinolkonzentration auf die Aktivität des bc_1 -Komplexes konnte auch experimentell in Chromatophoren beobachtet werden (Snozzi and Crofts, 1984). Für kinetische Messungen ist eine ausreichend hohe Konzentration an reduziertem Quinol es-

sentiell, so dass die Bindung nicht Raten limitierend für die beobachteten Prozesse der Quinoloxidation in der Q_o -Bindungsstelle wird.

Elektrometrische Messungen In den elektrometrischen Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde ein spezifischer Effekt bei Anwesenheit von Quinolen festgestellt. In Abwesenheit war sowohl unter reduktiven als auch unter oxidativen Bedingungen eine schnelle Phase anwesend, die sich nicht inhibieren ließ. Zusammen mit den spektroskopischen Messungen wurde sie dem Elektronentransfer zwischen Häm c_1 und dem Eisen-Schwefel-Cluster des Rieske-Proteins zugeordnet. Wie erwähnt, lässt sich das Vorzeichen des Ladungstransfers mit der Beobachtung unterschiedlicher Teilprozesse erklären. Quinoloxidation führt übereinstimmend mit den spektroskopischen Daten zu einer Millisekundenphasen, die sich durch Antimycin inhibieren ließ. Die Inhibition vergrößerte zusätzlich die beobachtete schnelle Phase. Antimycin bindet an der Q_i -Bindungsstelle und in seiner Anwesenheit werden die elektrogenen Prozesse von der b_H -Oxidation entkoppelt (Mulkidjanian and Junge, 1995). Nach Bindung von Antimycin kann das Enzym noch einen halben enzymatischen Zyklus durchlaufen (Crofts et al., 1983). Dies könnte ein Grund für die leichte Zunahme in der Amplitude der schnellen Phase sein, während die physiologische Reaktion unterlaufen wird. Kinetische Experimente mit dem bc_1 -Komplex stehen jedoch erst am Anfang und für mechanistische Implikationen ist es zu diesem Zeitpunkt noch zu früh. Weitere Messungen werden Klarheit in Bezug auf die Zuordnung und die Größe der einzelnen elektrogenen Phasen verschaffen.

5. Zusammenfassung

Protonen gekoppelter Elektronentransfer ist ein zentraler Bestandteil der chemiosmotischen Theorie. Die Beschreibung seiner Natur ist aufgrund seines transienten Charakters eine komplexe Aufgabe. Elektrometrische Messungen stellen hier eine große Hilfe in der Erfassung von Ladungsverschiebungen dar. Sie erlauben die zeitliche Beschreibung des Elektronen- und Protonentransportes, der mit kaum einer geeigneten Methode beobachtet werden kann, und geben Einblick in deren molekularen Mechanismus. Diese Technik wurde hier an drei verschiedenen Membrankomplexen der Atmungskette angewandt: der Cytochrom *c* Oxidase (COX) aus *Paracoccus denitrificans*, der Quinol-Fumarat-Reduktase (QFR) aus *Wolinella succinogenes* und dem bc_1 -Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae*. Hinsichtlich der experimentellen Vorgehensweise für kinetische Untersuchungen stellte sich ein übergreifendes Problem. Neben einer schnellen Aktivierung der Enzymsysteme bedurfte es eines definierten Ausgangszustands. Ziel dieser Arbeit war das Etablieren von Bedingungen, die elektrometrische Messungen am bc_1 -Komplex und der QFR erlauben, sowie die Fortführung dieser Methodik am bereits vorhandenen System der COX.

Cytochrom c Oxidase Elektrometrische Untersuchungen an der COX wurden basierend auf Vorarbeiten weitergeführt. Insbesondere die Ladungsverschiebungen nach Photoreduktion ausgehend vom völlig oxidierten Zustand rückten in den Fokus. In diesem Schritt wird ein Proton aufgenommen, während Häm *a* vom angeregten Zustand eines Rutheniumkomplexes reduziert wird.

Der Ausgangszustand der COX ist heterogen. Es wurde gezeigt, dass sich die für das Rinderherz angewandten Methoden zur Klassifizierung der heterogenen Zustände der COX nicht auf das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* übertragen lassen. So wurde die Geschwindigkeit der Cyanidbindung oder der Reduktion durch Dithionit nicht von Chlorid oder Inkubation bei niedrigem pH beeinflusst. Andererseits manifestierte sich die Präsenz von mindestens zwei verschiedenen Zuständen in den sichtbaren Spektren der Cyanidbindung und FT-IR Differenzspektren der CO-Photolyse am reduzierten Enzym.

Ein Faktor, der Einfluss sowohl auf die Spektren als auch auf die Protonenphase in den elektrometrischen Messungen nahm, stellte der pH-Wert dar. So führte eine Erhöhung der Protonenkonzentration zu einem reversiblen Verlust der Protonenphase. Der Verlust ging einher mit einer Verschiebung der Soretbande zu kürzeren Wellenlängen in den spektroskopischen Messungen. Beide Beobachtungen wiesen einen langsamen Zeitverlauf auf (≈ 1 h), der entweder eine Protonierungsreaktion der COX oder einen konformationellen Übergang widerspiegelt. Auf die Bindungskinetik von Cyanid hat er hingegen keinen Einfluss. Aufgrund dieses langsamen Überganges kommt es zu den beobachteten Heterogenitäten.

Insgesamt konnte für den O \rightarrow E-Übergang in den elektrometrischen Messungen nachgewiesen werden, dass die Protonenaufnahme unabhängig von den heterogenen Formen stattfand und diese auch nicht die Folge einer Fraktion an COX in einem teilreduzierten Zustand war. Die Anwesenheit von Chlorid oder das vorherige Durchlaufen eines katalytischen Zyklus hat auf diesen Übergang keinen Einfluss.

Der heterogene Ausgangszustand im O \rightarrow E-Übergang wurde in einem sequentiellen Mo-

dell diskutiert. Dabei wurde auf die Diskrepanz zwischen den elektrometrischen und den publizierten spektroskopischen Messungen hingewiesen. Während spektroskopisch die Cu_A-Oxidation und Häm *a*-Reduktion in einer Phase verliefen, wurde in den elektrometrischen Messungen eine zweite deutlich langsamere Phase für den Protonentransfer beobachtet. Ein sequentielles Reaktionsmodell führte hier zu einem Widerspruch. Die Auswirkungen auf die Natur der Kopplung von Häm *a* und dem aufgenommenen Proton wurden diskutiert.

Die Kinetik der Ladungsverschiebung wurde detailliert anhand der Temperaturabhängigkeit und des Isotopeneffektes untersucht. Der Elektronentransfer wurde im Rahmen der Marcus-Theorie analysiert. Der schnelle Elektronentransfer zwischen Cu_A und Häm *a* basiert auf einer geringen Reorganisationsenergie. Dieser ist unabhängig von Mutationen in den Protonenwegen und der Anwesenheit von Deuteriumoxid. Im Gegensatz hierzu konnte ein deutlicher Effekt einer Mutation im K-Kanal auf die Aktivierungsenergie des Protonentransfers beobachtet werden. Die Daten wurden im Sinne einer Energiebarriere diskutiert, die in einer Neuausrichtung oder Bildung einer Protonen leitenden Struktur unter der Kontrolle eines Lysinrestes im K-Kanal liegt. Weiterhin wurde eine mögliche Rolle des K-Kanals als Protonenreservoir bei Aufnahme eines weiteren Elektrons diskutiert und in den Zusammenhang des katalytischen Zyklus gestellt.

Die Ergebnisse konnten mit den Messungen an einem thermophilen Enzym, der *ba*₃-Oxidase aus *Thermus thermophilus*, verglichen werden. Obwohl diese den Lysinrest in dem Protonenkanal nicht besitzt, wies sie eine vergleichbare Aktivierungsenergie und Isotopeneffekt in der Protonenaufnahme auf. Aus den strukturellen Daten wurde ein Zusammenspiel zweier Aminosäuren vorgeschlagen, die den Lysinrest funktionell ersetzen können. Der Elektronentransfer benötigte dagegen eine höhere Reorganisationsenergie der Redoxzentren. Aus Vergleich mit den spektroskopischen Daten schien auch im thermophilen Enzym die Reduktion von Häm *b* mit der Aufnahme eines Protons verbunden zu sein.

Quinol-Fumarat-Reduktase Für eine schnelle Aktivierung der QFR wurde ein *caged* Fumarat synthetisiert, das nach Photolyse zu einer schnellen Erhöhung der Fumaratkonzentration führte. Die neue Substanz wurde bezüglich einer möglichen Verwendung für die QFR charakterisiert. Die Freisetzung erfolgte mit einer Zeitkonstante von 100 µs und aktivierte die QFR nur im photolysierten Zustand. Aufgrund der Photochemie der metallischen Kofaktoren in der QFR konnten jedoch keine kinetischen Messungen durchgeführt werden. Da die photochemisch induzierten Elektronenbewegungen in der QFR mit zunehmender Wellenlänge abnahmen, wurde eine neue Substanz vorgeschlagen, die im sichtbaren Spektralbereich gespalten werden kann.

*bc*₁-Komplex Der *bc*₁-Komplex kann wie die COX durch einen Rutheniumkomplex aktiviert werden. Ein dimerer sowie ein an Cytochrom *c* gekoppelter Rutheniumkomplex wurde hierfür anhand von Literaturdaten synthetisiert, und die Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften nach Lichtanregung charakterisiert. Für die elektrometrischen Messungen wurde der *bc*₁-Komplex in Proteoliposomen rekonstituiert, und der Ausgangszustand des *bc*₁-Komplexes unter reduktiven und oxidativen Bedingungen eingestellt. Mit dem dimeren Rutheniumkomplex wurden elektrometrische Experimente durchgeführt, die zu zwei Phasen in der Spannungsantwort führten. Die Daten wurden zusammen mit den publizierten spektroskopischen diskutiert. Dabei wurde eine schnelle elektrogene Phase einem Elektronentransfers zwischen Häm *c*₁ und dem Eisen-Schwefel-Cluster des Rieske-Proteins zugeordnet. Eine langsamere Phase erwies sich sensitiv gegenüber Antimycin und spiegelt Vorgänge unter der Kontrolle der Q_i-Bindungsstelle wider.

Literaturverzeichnis

- Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikström, M. (2000). The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nature Structural Biology*, 7(10):910–917.
- Adams, S. R. and Tsien, R. Y. (1993). Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annual Review of Physiology*, 55:755–784.
- Ädelroth, P., Brzezinski, P., and Malmström, B. G. (1995). Internal electron transfer in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 34(9):2844–2849.
- Ädelroth, P., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (1998). Role of the pathway through K(I-362) in proton transfer in cytochrome *c* oxidase from *R. sphaeroides*. *Biochemistry*, 37(8):2470–2476.
- Ädelroth, P., Sigurdson, H., Hallén, S., and Brzezinski, P. (1996). Kinetic coupling between electron and proton transfer in cytochrome *c* oxidase: simultaneous measurements of conductance and absorbance changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22):12292–12297.
- Agmon, N. (1995). The Grotthuss mechanism. *Chemical Physics Letters*, 244(5-6):456–462.
- Akeson, M. and Deamer, D. (1991). Proton conductance by the gramicidin water wire. Model for proton conductance in the F_1F_0 ATPases? *Biophysical Journal*, 60(1):101–109.
- Anderson, G. and Callahan, F. (1960). *t*-Butyl Esters of Amino Acids and Peptides and their Use on Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 82:3359–3363.
- Antalik, M., Jancura, D., Palmer, G., and Fabian, M. (2005). A role for the protein in internal electron transfer to the catalytic center of cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 44(45):14881–14889.
- Antonini, G., Brunori, M., Colosimo, A., Greenwood, C., and Wilson, M. T. (1977). Oxygen „pulsed“ cytochrome *c* oxidase: Functional properties and catalytic relevance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(8):3128–3132.
- Antonini, G., Brunori, M., Colosimo, A., Malatesta, F., and Sarti, P. (1985). Pulsed cytochrome *c* oxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 23(3-4):289–293.
- Azarkina, N. and Konstantinov, A. A. (2002). Stimulation of menaquinone-dependent electron transfer in the respiratory chain of *Bacillus subtilis* by membrane energization. *Journal of Bacteriology*, 184(19):5339–5347.
- Babcock, G. T. and Wikström, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*, 356(6367):301–309.
- Baker, G., Noguchi, M., and Palmer, G. (1987). The reaction of cytochrome oxidase with cyanide. Preparation of the rapidly reacting form and its conversion to the slowly reacting form. *Journal of Biological Chemistry*, 262(2):595–604.

- Balakrishnan, G., Mohandas, P., and Umapathy, S. (1996). Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopic Studies on the Radical Anions of Menaquinone and Naphthoquinone. *Journal of Physical Chemistry*, 100:16472–16478.
- Balakrishnan, G. and Umapathy, S. (1999). Photogenerated radical intermediates of vitamin K₁: a time-resolved resonance Raman study. *Journal of Molecular Structure*, 475(1):5–11.
- Bamberg, E., Apell, H., Dencher, N., Sperling, W., Stieve, H., and Lauser, P. (1979). Photocurrents Generated by Bacteriorhodopsin on Planar Lipid Bilayers. *Biophysics of Structure and Mechanism*, 5:277–292.
- Barth, A. and Corrie, J. E. T. (2002). Characterization of a New Caged Proton Capable of Inducing Large pH Jumps. *Biophysical Journal*, 83(5):2864–2871.
- Barth, A., Corrie, J. E. T., Gradwell, M. J., Maeda, Y., Mantele, W., Meier, T., and Trentham, D. R. (1997). Time-resolved infrared spectroscopy of intermediates and products from photolysis of 1-(2-nitrophenyl)ethyl phosphates - reaction of the 2-nitrosoacetophenone byproduct with thiols. *Journal of the American Chemical Society*, 119(18):4149–4159.
- Barth, A., Hauser, K., Mantele, W., Corrie, J. E. T., and Trentham, D. R. (1995). Photochemical release of ATP from caged ATP studied by time-resolved infrared spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 117(41):10311–10316.
- Bartoschek, S., Johansson, M., Geierstanger, B. H., Okun, J. G., Lancaster, C. R. D., Humpfer, E., Yu, L., Yu, C.-A., Griesinger, C., and Brandt, U. (2001). Three Molecules of Ubiquinone Bind Specifically to Mitochondrial Cytochrome *bc*₁ Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38):35231–35234.
- Baymann, F., Robertson, D. E., Dutton, P. L., and Mantele, W. (1999). Electrochemical and spectroscopic investigations of the cytochrome *bc*₁ complex from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*, 38(40):13188–13199.
- Behr, J., Hellwig, P., Mantele, W., and Michel, H. (1998). Redox dependent changes at the heme propionates in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*: direct evidence from FTIR difference spectroscopy in combination with heme propionate ¹³C labeling. *Biochemistry*, 37(20):7400–7406.
- Behr, J., Michel, H., Mantele, W., and Hellwig, P. (2000). Functional properties of the heme propionates in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Evidence from FTIR difference spectroscopy and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 39(6):1356–1363.
- Beinert, H. (2002). Spectroscopy of succinate dehydrogenases, a historical perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(1-2):7–22.
- Belevich, I., Verkhovsky, M. I., and Wikstrom, M. (2006). Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome *c* oxidase. *Nature*, 440(7085):829–832.
- Bell, R. P. (1974). Recent Advances in the Study of Kinetic Hydrogen Isotope Effects. *Chemical Society Reviews*, pages 513–544.
- Beratan, D. N., Onuchic, J. N., Winkler, J. R., and Gray, H. B. (1992). Electron-tunneling pathways in proteins. *Science*, 258(5089):1740–1741.
- Berden, J. A. and Slater, E. C. (1970). The reaction of antimycin with a cytochrome *b* preparation active in reconstitution of the respiratory chain. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 216(2):237–249.

- Berry, E., Huang, L.-S., Saechao, L., Pon, N., Valkova-Valchanova, M., and Daldal, F. (2004). X-Ray Structure of *Rhodobacter capsulatus* Cytochrome bc_1 : Comparison with its Mitochondrial and Chloroplast Counterparts. *Photosynthesis Research*, 81(3):251–275.
- Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.-s., and Crofts, A. R. (2000). Structure and Function of Cytochrome bc Complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1):1005–1075.
- Bickar, D., Bonaventura, J., and Bonaventura, C. (1982). Cytochrome c oxidase binding of hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 21(11):2661–2666.
- Biel, S., Simon, J., Gross, R., Ruiz, T., Ruitenbergh, M., and Kröger, A. (2002). Reconstitution of coupled fumarate respiration in liposomes by incorporating the electron transport enzymes isolated from *Wolinella succinogenes*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 269(7):1974–1983.
- Bloch, D., Belevich, I., Jasaitis, A., Ribacka, C., Puustinen, A., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2004). The catalytic cycle of cytochrome c oxidase is not the sum of its two halves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2):529–533.
- Blomberg, M. R. A., Siegbahn, P. E. M., and Wikström, M. (2003). Metal-bridging mechanism for O-O bond cleavage in cytochrome c oxidase. *Inorganic Chemistry*, 42(17):5231–5243.
- Borlinghaus, R., Apell, H. J., and Läger, P. (1987). Fast charge translocations associated with partial reactions of the Na,K-pump: I. Current and voltage transients after photochemical release of ATP. *The Journal of Membrane Biology*, 97(3):161–178.
- Bowyer, J. R. and Crofts, A. R. (1981). On the mechanism of photosynthetic electron transfer in *Rhodopseudomonas capsulata* and *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 636(2):218–233.
- Bränden, G., Bränden, M., Schmidt, B., Mills, D. A., Ferguson-Miller, S., and Brzezinski, P. (2005). The protonation state of a heme propionate controls electron transfer in cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 44(31):10466–10474.
- Bränden, G., Pawate, A. S., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2006). Controlled uncoupling and recoupling of proton pumping in cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(2):317–322.
- Bränden, M., Sigurdson, H., Namslauer, A., Gennis, R. B., Ädelroth, P., and Brzezinski, P. (2001). On the role of the K-proton transfer pathway in cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9):5013–5018.
- Bränden, M., Tomson, F., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2002). The entry point of the K-proton-transfer pathway in cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 41(35):10794–10798.
- Brandt, U. (1996a). Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome bc_1 complex by proton-gated charge transfer. *FEBS Letters*, 387(1):1–6.
- Brandt, U. (1996b). Energy conservation by bifurcated electron-transfer in the cytochrome bc_1 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1275(1-2):41–46.
- Brandt, U. (1998). The chemistry and mechanics of ubihydroquinone oxidation at center P (Q_o) of the cytochrome bc_1 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1365(1-2):261–268.
- Brandt, U., Kerscher, S., Dröse, S., Zwicker, K., and Zickermann, V. (2003). Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Letters*, 545(1):9–17.

- Brandt, U., Schägger, H., and von Jagow, G. (1989). Purification of cytochrome-*c* oxidase retaining its pulsed form. *European Journal of Biochemistry*, 182(3):705–11.
- Brandt, U. and von Jagow, G. (1991). Analysis of inhibitor binding to the mitochondrial cytochrome *c* reductase by fluorescence quench titration. Evidence for a 'catalytic switch' at the Q_o center. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 195(1):163–170.
- Brooks, J. L., Sucheta, A., and Einarsdóttir, O. (1997). Light-induced spectral changes in fully oxidized cytochrome *c* oxidase in the presence of oxygen. *Biochemistry*, 36(21):6336–6342.
- Brudvig, G. W., Stevens, T. H., Morse, R. H., and Chan, S. I. (1981). Conformations of oxidized cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 20(13):3912–3921.
- Brzezinski, P. (1996). Internal electron-transfer reactions in cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 35(18):5611–5615.
- Brzezinski, P. (2004). Redox-driven membrane-bound proton pumps. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(7):380–387.
- Brzezinski, P. and Larsson, G. (2003). Redox-driven proton pumping by heme-copper oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1605(1-3):1–13.
- Brzezinski, P. and Malmström, B. G. (1985). The reduction of cytochrome *c* oxidase by carbon monoxide. *FEBS Letters*, 187(1):111–114.
- Budiman, K., Kannt, A., Lyubenova, S., Richter, O.-M. H., Ludwig, B., Michel, H., and MacMillan, F. (2004). Tyrosine 167: the origin of the radical species observed in the reaction of cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide in *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*, 43(37):11709–11716.
- Burleigh, B D, J., Foust, G. P., and Williams, C H, J. (1969). A method for titrating oxygen-sensitive organic redox systems with reducing agents in solution. *Analytical Biochemistry*, 27(3):536–544.
- Cape, J. L., Bowman, M. K., and Kramer, D. M. (2005). Reaction intermediates of quinol oxidation in a photoactivatable system that mimics electron transfer in the cytochrome *bc*₁ complex. *Journal of the American Chemical Society*, 127(12):4208–4215.
- Capitanio, N., Capitanio, G., Boffoli, D., and Papa, S. (2000a). The proton/electron coupling ratio at heme *a* and Cu_A in bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 39(50):15454–15461.
- Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E., Boffoli, D., and Papa, S. (2003). Proton transfer reactions associated with the reaction of the fully reduced, purified cytochrome *c* oxidase with molecular oxygen and ferricyanide. *Biochemistry*, 42(16):4607–4612.
- Capitanio, N., Capitanio, G., Minuto, M., De Nitto, E., Palese, L. L., Nicholls, P., and Papa, S. (2000b). Coupling of electron transfer with proton transfer at heme *a* and Cu_A (redox Bohr effects) in cytochrome *c* oxidase. Studies with the carbon monoxide inhibited enzyme. *Biochemistry*, 39(21):6373–6379.
- Chance, B., Saronio, C., and Leigh, J. S. J. (1975). Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(24):9226–9237.
- Chang, C. J., Chang, M. C. Y., Damrauer, N. H., and Nocera, D. G. (2004). Proton-coupled electron transfer: a unifying mechanism for biological charge transport, amino acid radical initiation and propagation, and bond making/breaking reactions of water and oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:13–28.

- Chang, C. J., Chng, L. L., and Nocera, D. G. (2003). Proton-coupled O-O activation on a redox platform bearing a hydrogen-bonding scaffold. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7):1866–1876.
- Chazotte, B. and Hackenbrock, C. (1988). The multicollisional, obstructed, long-range diffusional nature of mitochondrial electron transport. *Journal of Biological Chemistry*, 263(28):14359–14367.
- Cherepanov, D. A., Feniouk, B. A., Junge, W., and Mulkidjanian, A. Y. (2003). Low Dielectric Permittivity of Water at the Membrane Interface: Effect on the Energy Coupling Mechanism in Biological Membranes. *Biophysical Journal*, 85(2):1307–1316.
- Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I., and Mulkidjanian, A. Y. (2001). Photosynthetic Electron Transfer Controlled by Protein Relaxation: Analysis by Langevin Stochastic Approach. *Biophysical Journal*, 80(3):1033–1049.
- Christensen, B., Gutweiler, M., Grell, E., Wagner, N., Pabst, R., Dose, K., and Bamberg, E. (1988). Pump and displacement currents of reconstituted ATP synthase on black lipid membranes. *Journal of Membrane Biology*, 104(2):179–191.
- Clark, C. D. and Hoffman, M. Z. (1996). Solvent reorganization energy in excited-state electron-transfer reactions: quenching and geminate-pair back electron transfer. *Journal of Physical Chemistry*, 100(35):14688–93.
- Cleland, W. W. (2000). Low-Barrier Hydrogen Bonds and Enzymatic Catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382(1):1–5.
- Clore, G. M. (1980). Characterization of the intermediates in the reaction of membrane-bound mixed-valence-state cytochrome oxidase with oxygen at low temperatures by optical spectroscopy in the visible region. *Biochemical Journal*, 187(3):617–22.
- Clore, G. M., Andreasson, L. E., Karlsson, B., Aasa, R., and Malmström, B. G. (1980). Characterization of the intermediates in the reaction of mixed-valence state soluble cytochrome oxidase with oxygen at low temperatures by optical and electron-paramagnetic-resonance spectroscopy. *Biochemical Journal*, 185(1):155–67.
- Collman, J. P., Boulatov, R., Sunderland, C. J., and Fu, L. (2004). Functional Analogues of Cytochrome *c* Oxidase, Myoglobin and Hemoglobin. *Chemical Reviews*, 104:561–588.
- Cooper, C. E., Jünemann, S., Ioannidis, N., and Wrigglesworth, J. M. (1993). Slow „resting“ forms of mitochondrial cytochrome *c* oxidase consist of two kinetically distinct conformations of the binuclear Cu_B/*a*₃ centre – relevance to the mechanism of proton translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1144(2):149–160.
- Corrie, J. E. T., Barth, A., Munasinghe, V. R. N., Trentham, D. R., and Hutter, M. C. (2003). Photolytic cleavage of 1-(2-nitrophenyl)ethyl ethers involves two parallel pathways and product release is rate-limited by decomposition of a common hemiacetal intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 125(28):8546–8554.
- Coutts, D. and Paterson, R. (1986). Photochemically activated electron transport across unilamellar liposomes using coenzyme Q₁₀ and vitamin K₁ as carriers. *Journal of Membrane Science*, 27(2):275–281.
- Covian, R., Gutierrez-Cirlos, E. B., and Trumpower, B. L. (2004). Anti-cooperative Oxidation of Ubiquinol by the Yeast Cytochrome *bc*₁ Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15):15040–15049.

- Covian, R. and Trumpower, B. L. (2005). Rapid Electron Transfer between Monomers when the Cytochrome bc_1 Complex Dimer Is Reduced through Center N. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24):22732–22740.
- Crofts, A. R. (2004a). The Cytochrome bc_1 Complex: Function in the Context of Structure. *Annual Review of Physiology*, 66(1):689–733.
- Crofts, A. R. (2004b). Proton-coupled electron transfer at the Q_o -site of the bc_1 complex controls the rate of ubiquinone oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:77–92.
- Crofts, A. R., Barquera, B., Gennis, R. B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E. A. (1999a). Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc_1 complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry*, 38(48):15807–15826.
- Crofts, A. R., Hong, S. J., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E. A. (1999b). Pathways for proton release during ubiquinone oxidation by the bc_1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18):10021–10026.
- Crofts, A. R., Lhee, S., Crofts, S. B., Cheng, J., and Rose, S. (2006). Proton pumping in the bc_1 complex: A new gating mechanism that prevents short circuits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, In Press, Corrected Proof.
- Crofts, A. R., Meinhardt, S. W., Jones, K. R., and Snozzi, M. (1983). The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides* A modified Q-cycle mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 723(2):202–218.
- Crofts, A. R., Shinkarev, V. P., Kolling, D. R. J., and Hong, S. (2003). The Modified Q-cycle Explains the Apparent Mismatch between the Kinetics of Reduction of Cytochromes c_1 and b_h in the bc_1 Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38):36191–36201.
- Crofts, A. R. and Wang, Z. (1989). How rapid are the internal reactions of the ubiquinol:cytochrome c_2 oxidoreductase? *Photosynthesis Research*, 22:69–87.
- Crofts, A. R. and Wraight, C. A. (1983). The electrochemical domain of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 726(3):149–185.
- Cukier, R. I. (1994). Mechanism for proton-coupled electron-transfer reactions. *Journal of Physical Chemistry*, 98(9):2377–2381.
- Cukier, R. I. (2004). Theory and simulation of proton-coupled electron transfer, hydrogen-atom transfer, and proton translocation in proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:37–44.
- Cukier, R. I. (2005). A molecular dynamics study of water chain formation in the proton-conducting K channel of cytochrome c oxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1706(1-2):134–146.
- Cukier, R. I. and Nocera, D. G. (1998). Proton-Coupled Electron Transfer. *Annual Review of Physical Chemistry*, 49(1):337–369.
- Darrouzet, E., Moser, C. C., Dutton, P. L., and Daldal, F. (2001). Large scale domain movement in cytochrome bc_1 : a new device for electron transfer in proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(7):445–451.

- Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M., and Daldal, F. (2002). The [2Fe-2S] cluster E_m as an indicator of the iron-sulfur subunit position in the ubihydroquinone oxidation site of the cytochrome *bc*₁ complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(5):3464–3470.
- Das, T. K., Tomson, F. L., Gennis, R. B., Gordon, M., and Rousseau, D. L. (2001). pH-Dependent Structural Changes at the Heme-Copper Binuclear Center of Cytochrome *c* Oxidase. *Biophysical Journal*, 80(5):2039–2045.
- Dawson, R., Elliot, D., Elliot, W., and Jones, K. (1986). *Data for Biochemical Research*. Oxford Science Publ., 3rd edition.
- de Gier, J. W., Lubben, M., Reijnders, W. N., Tipker, C. A., Slotboom, D. J., van Spanning, R. J., Stouthamer, A. H., and van der Oost, J. (1994). The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Molecular Microbiology*, 13(2):183–196.
- De Vries, S., Albracht, S. P. J., Berden, J. A., and Slater, E. C. (1982). The pathway of electrons through QH₂:cytochrome *c* oxidoreductase studied by pre-steady-state kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 681(1):41–53.
- Deamer, D. W. and Nichols, J. W. (1983). Proton-Hydroxide Permeability of Liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(1):165–168.
- DeCoursey, T. E. (2003). Voltage-Gated Proton Channels and Other Proton Transfer Pathways. *Physiological Reviews*, 83(2):475–579.
- DeCoursey, T. E. and Cherny, V. V. (2000). Common themes and problems of bioenergetics and voltage-gated proton channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1458(1):104–119.
- Denmark, S., A., T., and DS., M. (1996). Tandem [4+2]/[3+2] Cycloadditions of Nitroalkenes. 9. Synthesis of (-)-Rosmarinecine [Review]. *Journal of the American Chemical Society*, 118(3):8266–8277.
- Dikanov, S. A., Samoilova, R. I., Kolling, D. R. J., Holland, J. T., and Crofts, A. R. (2004). Hydrogen Bonds Involved in Binding the Q_i-site Semiquinone in the *bc*₁ Complex, Identified through Deuterium Exchange Using Pulsed EPR. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16):15814–15823.
- Ding, H., Moser, C. C., Robertson, D. E., Tokito, M. K., Daldal, F., and Dutton, P. L. (1995). Ubiquinone pair in the Q_o site central to the primary energy conversion reactions of cytochrome *bc*₁ complex. *Biochemistry*, 34(49):15979–15996.
- Ding, H., Robertson, D. E., Daldal, F., and Dutton, P. L. (1992). Cytochrome *bc*₁ complex [2Fe-2S] cluster and its interaction with ubiquinone and ubihydroquinone at the Q_o site: a double-occupancy Q_o site model. *Biochemistry*, 31(12):3144–3158.
- Downard, A. J., Honey, G. E., Phillips, L. F., and Steel, P. J. (1991). Synthesis and Properties of a Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) Dimer Directly Coupled at the C4 Carbon. *Inorganic Chemistry*, 30:2259–2260.
- Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Semenov, A. Y., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1979). Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins. *Analytical Biochemistry*, 96(1):250–262.
- Drachev, L. A., Kaurov, B. S., Mamedov, M. D., Mulkidjanian, A. Y., Semenov, A. Y., Shinkarev, V. P., Skulachev, V. P., and Verkhovsky, M. I. (1989). Flash-induced electrogenic events in the photosynthetic reaction center and *bc*₁ complexes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 973:189–197.

- Eglinton, D. G., Hill, B. C., Greenwood, C., and Thomson, A. J. (1984). Low temperature magnetic circular Dichroism Spectra and magnetization properties of Extracted Heme a^{3+} Bis-Imidazole : A Model of Cytochrome a in Bovine Cytochrome c Oxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 21(1):1–8.
- Eglinton, D. G., Johnson, M. K., Thomson, A. J., Gooding, P. E., and Greenwood, C. (1980). Near-infrared magnetic and natural circular dichroism of cytochrome c oxidase. *The Biochemical Journal*, 191(2):319–331.
- Eigen, M. (1964). Proton Transfer, Acid-Base Catalysis, and Enzymatic Hydrolysis. Part I: Elementary Processes. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 3(1):1–19.
- Einarsdóttir, O. and Szundi, I. (2004). Time-resolved optical absorption studies of cytochrome oxidase dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:263–273.
- Einarsdóttir, O., Szundi, I., Van Eps, N., and Sucheta, A. (2002). P_M and P_R forms of cytochrome c oxidase have different spectral properties. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1):87–93.
- Engstrom, G., Rajagukguk, R., Saunders, A. J., Patel, C. N., Rajagukguk, S., Merbitz-Zahradnik, T., Xiao, K. H., Pielak, G. J., Trumpower, B., Yu, C. A., Yu, L., Durham, B., and Millett, F. (2003). Design of a ruthenium-labeled cytochrome c derivative to study electron transfer with the cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry*, 42(10):2816–2824.
- Engstrom, G., Xiao, K., Yu, C.-A., Yu, L., Durham, B., and Millett, F. (2002). Photoinduced Electron Transfer between the Rieske Iron-Sulfur Protein and Cytochrome c_1 in the *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome bc_1 Complex. Effects of pH, Temperature, and Driving Force. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34):31072–31078.
- Ernster, L., Danielson, L., and Ljunggren, M. (1962). DT Diaphorase I. Purification from the soluble fraction of rat-liver cytoplasm, and properties. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 58(2):171–188.
- Esser, L., Quinn, B., Li, Y.-F., Zhang, M., Elberry, M., Yu, L., Yu, C.-A., and Xia, D. (2004). Crystallographic Studies of Quinol Oxidation Site Inhibitors: A Modified Classification of Inhibitors for the Cytochrome bc_1 Complex. *Journal of Molecular Biology*, 341(1):281–302.
- Fabian, M. and Malmström, B. G. (1989). The effect of pH changes on the optical spectrum of oxidised cytochrome oxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 973(3):414–419.
- Fabian, M. and Palmer, G. (1995). The interaction of cytochrome oxidase with hydrogen peroxide: the relationship of compounds P and F. *Biochemistry*, 34(42):13802–13810.
- Fabian, M. and Palmer, G. (2001). Proton involvement in the transition from the “peroxy” to the ferryl intermediate of cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 40(6):1867–1874.
- Fabian, M., Skultety, L., Brunel, C., and Palmer, G. (2001). Cyanide stimulated dissociation of chloride from the catalytic center of oxidized cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 40(20):6061–6069.
- Fabian, M., Skultety, L., Jancura, D., and Palmer, G. (2004). Implications of ligand binding studies for the catalytic mechanism of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:298–305.
- Fabian, M., Thornstrom, P. E., Brzezinski, P., and Malmström, B. G. (1987). Two-electron reduction is required for rapid internal electron transfer in resting, pulsed and oxygenated cytochrome c oxidase. *FEBS Letters*, 213(2):396–400.

- Fabian, M., Wong, W. W., Gennis, R. B., and Palmer, G. (1999). Mass spectrometric determination of dioxygen bond splitting in the „peroxy“ intermediate of cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23):13114–13117.
- Fahr, A., Lauser, P., and Bamberg, E. (1981). Photocurrent kinetics of Purple-Membrane Sheets Bound to Planar Lipid Membranes. *Journal of Membrane Biology*, 60:51–62.
- Fann, Y. C., Ahmed, I., Blackburn, N. J., Boswell, J. S., Verkhovskaya, M. L., Hoffman, B. M., and Wikstrom, M. (1995). Structure of Cu_B in the binuclear heme-copper center of the cytochrome *aa*₃-type quinol oxidase from *Bacillus subtilis*: an ENDOR and EXAFS study. *Biochemistry*, 34(32):10245–10255.
- Farver, O., Chen, Y., Fee, J. A., and Pecht, I. (2006a). Electron transfer among the Cu_A-, heme *b*- and *a*₃-centers of *Thermus thermophilus* cytochrome *ba*₃. *FEBS Letters*, 580(14):3417–3421.
- Farver, O., Einarsdottir, O., and Pecht, I. (2000). Electron transfer rates and equilibrium within cytochrome *c* oxidase. *European Journal of Biochemistry*, 267(4):950–954.
- Farver, O., Grell, E., Ludwig, B., Michel, H., and Pecht, I. (2006b). Rates and Equilibrium of Cu_A to Heme *a* Electron Transfer in *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c* Oxidase. *Biophysical Journal*, 90(6):2131–2137.
- Faxen, K., Gilderson, G., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2005). A mechanistic principle for proton pumping by cytochrome *c* oxidase. *Nature*, 437(7056):286–289.
- Fendler, K., Hartung, K., Nagel, G., and Bamberg, E. (1998). Investigation of charge translocation by ion pumps and carriers using caged substrates. *Methods in Enzymology*, 291:289–306.
- Ferguson, S. J. (2000). Proton transfer: It’s a stringent process. *Current Biology*, 10(17):R627–R630.
- Ferguson-Miller, S & Babcock, G. T. (1996). Heme/Copper Terminal Oxidases. *Chemical Reviews*, 96(7):2889–2907.
- Fernandes, A. S., Konstantinov, A. A., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2005). Quinone reduction by *Rhodothermus marinus* succinate:menaquinone oxidoreductase is not stimulated by the membrane potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(2):565–570.
- Forte, E., Barone, M. C., Brunori, M., Sarti, P., and Giuffre, A. (2002). Redox-linked Protonation of Cytochrome *c* Oxidase: The Effect of Chloride bound to Cu_B. *Biochemistry*, 41(43):13046–13052.
- Forte, E., Scandurra, F. M., Richter, O.-M. H., D’Ittri, E., Sarti, P., Brunori, M., Ludwig, B., and Giuffre, A. (2004). Proton uptake upon anaerobic reduction of the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase: a kinetic investigation of the K354M and D124N mutants. *Biochemistry*, 43(10):2957–2963.
- Garczarek, F. and Gerwert, K. (2006). Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy. *Nature*, 439(7072):109–112.
- Gee, K., Wieboldt, R., and Hess, G. (1994). Synthesis and Photochemistry of a new photolabile derivative of GABA. Neurotransmitter Release and Receptor activation in the microsecond time region. *Journal of the American Chemical Society*, 116:8366–8367.
- Gennis, R. B. (1998). Multiple proton-conducting pathways in cytochrome oxidase and a proposed role for the active-site tyrosine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1365(1-2):241–248.

- Gennis, R. B., Barquera, B., Hacker, B., Van Doren, S. R., Arnaud, S., Crofts, A. R., Davidson, E., Gray, K. A., and Daldal, F. (1993). The bc_1 complexes of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter capsulatus*. *Journal Of Bioenergetics And Biomembranes*, 25(3):195–209.
- Geren, L., Hahm, S., Durham, B., and Millett, F. (1991). Photoinduced electron transfer between cytochrome *c* peroxidase and yeast cytochrome *c* labeled at Cys 102 with (4-bromomethyl-4'-methylbipyridine)[bis(bipyridine)]ruthenium²⁺. *Biochemistry*, 30(39):9450–9457.
- Geren, L. M., Beasley, J. R., Fine, B. R., Saunders, A. J., Hibdon, S., Pielak, G. J., Durham, B., and Millett, F. (1995). Design of a Ruthenium-Cytochrome *c* Derivative to Measure Electron Transfer to the Initial Acceptor in Cytochrome *c* Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(6):2466–2472.
- Giuffré, A., Barone, M. C., Brunori, M., D'Itri, E., Ludwig, B., Malatesta, F., Müller, H.-W., and Sarti, P. (2002). Nitric oxide reacts with the single-electron reduced active site of cytochrome *c* oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(25):22402–22406.
- Giuffré, A., Sarti, P., D'Itri, E., Buse, G., Soulimane, T., and Brunori, M. (1996). On the mechanism of inhibition of cytochrome *c* oxidase by nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52):33404–33408.
- Giuffré, A., Stubauer, G., Brunori, M., Sarti, P., Torres, J., and Wilson, M. T. (1998). Chloride Bound to Oxidized Cytochrome *c* Oxidase Controls the Reaction with Nitric Oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49):32475–32478.
- Glasoe, P. and Long, F. (1960). Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxide. *Journal of Physical Chemistry*, 64:188–190.
- Gorbikova, E. A., Vuorilehto, K., Wikstrom, M., and Verkhovsky, M. I. (2006). Redox Titration of All Electron Carriers of Cytochrome *c* Oxidase by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 45(17):5641–5649.
- Graf, M., Bokranz, M., Bocher, R., Friedl, P., and Kröger, A. (1985). Electron transport driven phosphorylation catalyzed by proteoliposomes containing hydrogenase, fumarate reductase and ATP synthase. *FEBS Letters*, 184(1):100–103.
- Gray, H. B. and Winkler, J. R. (1996). Electron transfer in proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 65:537–561.
- Gray, H. B. and Winkler, J. R. (2005). Long-Range Electron Transfer Special Feature: Long-range electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(10):3534–3539.
- Greenwood, C., Wilson, M. T., and Brunori, M. (1974). Studies on partially reduced mammalian cytochrome oxidase. Reactions with carbon monoxide and oxygen. *The Biochemical Journal*, 137(2):205–215.
- Grewer, C., Jager, J., Carpenter, B. K., and Hess, G. P. (2000). A new photolabile precursor of glycine with improved properties: A tool for chemical kinetic investigations of the glycine receptor. *Biochemistry*, 39(8):2063–2070.
- Grivennikova, V. G., Gavrikova, E. V., Timoshin, A. A., and Vinogradov, A. D. (1993). Fumarate reductase activity of bovine heart succinate-ubiquinone reductase. New assay system and overall properties of the reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1140(3):282–292.
- Grzesiek, S. and Dencher, N. (1986). Dependency of delta pH-relaxation across vesicular membranes on the buffering power of bulk solutions and lipids. *Biophysical Journal*, 50(2):265–276.

- Gu, Y. G., Li, P. S., Sage, J. T., and Champion, P. M. (1993). Photoreduction of heme proteins - spectroscopic studies and cross-section measurements. *Journal of the American Chemical Society*, 115(12):4993–5004.
- Gutierrez-Cirlos, E. B. and Trumpower, B. L. (2002). Inhibitory Analogs of Ubiquinol Act Anti-cooperatively on the Yeast Cytochrome bc_1 Complex. Evidence for an Alternating Half-of-the-Sites Mechanism of Ubiquinol Oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2):1195–1202.
- Gutman, M. and Nachliel, E. (1990). The dynamic aspects of proton transfer processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1015(3):391–414.
- Haas, A., Sauer, U. S., Gross, R., Simon, J., Mäntele, W., and Lancaster, C. R. (2005). FTIR Difference Spectra of *Wolinella succinogenes* Quinol:Fumarate Reductase Support a Key Role of Glu C180 within the „E-Pathway Hypothesis“ of Coupled Transmembrane Electron and Proton Transfer. *Biochemistry*, 44(42):13949–13961.
- Haas, A. H. and Lancaster, C. R. D. (2004). Calculated Coupling of Transmembrane Electron and Proton Transfer in Dihemic Quinol:Fumarate Reductase. *Biophysical Journal*, 87(6):4298–4315.
- Hagen, V., Bendig, J., Frings, S., Eckardt, T., Helm, S., Reuter, D., and Kaupp, U. B. (2001). Highly Efficient and Ultrafast Phototriggers for cAMP and cGMP by Using Long-Wavelength UV/Vis-Activation. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(6):1046–1048.
- Hagen, V., Frings, S., Wiesner, B., Helm, S., Kaupp, U. B., and Bendig, J. (2003). 7-(Dialkylamino)coumarin-4-yl]methyl-Caged Compounds as Ultrafast and Effective Long-Wavelength Phototriggers of 8-Bromo-Substituted Cyclic Nucleotides. *ChemBioChem: a European Journal Of Chemical Biology*, 4(5):434–442.
- Hagerhall, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases; Variations on a conserved theme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(2):107–141.
- Haines, T. H. (2001). Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Progress in Lipid Research*, 40(4):299–324.
- Hallén, S. and Brzezinski, P. (1994). Light-induced structural changes in cytochrome *c* oxidase: implication for the mechanism of electron and proton gating. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1184(2-3):207–218.
- Hallén, S., Brzezinski, P., and Malmström, B. G. (1994). Internal electron transfer in cytochrome *c* oxidase is coupled to the protonation of a group close to the bimetallic site. *Biochemistry*, 33(6):1467–1472.
- Hallén, S. and Nilsson, T. (1992). Proton transfer during the reaction between fully reduced cytochrome *c* oxidase and dioxygen: pH and deuterium isotope effects. *Biochemistry*, 31(47):11853–11859.
- Haltia, T., Semo, N., Arrondo, J. L., Goni, F. M., and Freire, E. (1994). Thermodynamic and structural stability of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*, 33(32):9731–9740.
- Hammes-Schiffer, S. (2001). Theoretical perspectives on proton-coupled electron transfer reactions. *Accounts of Chemical Research*, 34(4):273–281.
- Hammes-Schiffer, S. (2002). Comparison of hydride, hydrogen atom, and proton-coupled electron transfer reactions. *Chemphyschem: a European Journal Of Chemical Physics And Physical Chemistry*, 3(1):33–42.

- Han, S. H., Ching, Y. C., and Rousseau, D. L. (1990). Ferryl and hydroxy intermediates in the reaction of oxygen with reduced cytochrome *c* oxidase. *Nature*, 348:89–90.
- Hansen, K. C., Schultz, B. E., Wang, G., and Chan, S. I. (2000). Reaction of *Escherichia coli* cytochrome *bo*₃ and mitochondrial cytochrome *bc*₁ with a photoreleasable decylubiquinol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1456(2-3):121–137.
- Harrenga, A. and Michel, H. (1999). The Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans* Does Not Change the Metal Center Ligation upon Reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(47):33296–33299.
- Hatcher, E., Soudackov, A., and Hammes-Schiffer, S. (2005). Comparison of dynamical aspects of nonadiabatic electron, proton, and proton-coupled electron transfer reactions. *Chemical Physics*, 319(1-3 Special Issue SI):93–100.
- Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., and Mänteles, W. (1999a). Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme *a* and *a*₃ redox reactions in the cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*: separation of heme *a* and *a*₃ contributions and assignment of vibrational modes. *Biochemistry*, 38(6):1685–1694.
- Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Mänteles, W. (1999b). Electrochemical, FTIR, and UV/VIS Spectroscopic Properties of the *ba*₃ Oxidase from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, 38(30):9648–9658.
- Hendler, R. W., Harmon, P. A., and Levin, I. W. (1994). Near infrared spectral changes of cytochrome *aa*₃ during potentiometric titrations. *Biophysical Journal*, 67(6):2493–2500.
- Hendler, R. W., Pardhasaradhi, K., Reynafarje, B., and Ludwig, B. (1991). Comparison of energy-transducing capabilities of the two- and three-subunit cytochromes *aa*₃ from *Paracoccus denitrificans* and the 13-subunit beef heart enzyme. *Biophysical Journal*, 60(2):415–423.
- Hendler, R. W. and Westerhoff, H. V. (1992). Redox interactions in cytochrome *c* oxidase: from the neoclassical toward modern models. *Biophysical Journal*, 63(6):1586–1604.
- Hess, G. P. (2003). Rapid chemical reaction techniques developed for use in investigations of membrane-bound proteins (neurotransmitter receptors). *Biophysical Chemistry*, 100(1-3):493–506.
- Holloway, P. W. (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Analytical Biochemistry*, 53(1):304–308.
- Holm, D. E., Godette, G., Bonaventura, J., Bonaventura, C., and Peterson, J. (1995). The site of the redox-linked proton pump in eukaryotic cytochrome *c* oxidases. *FEBS Letters*, 370(1-2):53–58.
- Holz, M. (1990). *Biophysikalische Relaxationsanalyse mit kontinuierlichen Relaxationsspektren*. Doktorarbeit, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Hopfield, J. J. (1974). Electron Transfer between Biological Molecules by Thermally Activated Tunneling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(9):3640–3644.
- Hosler, J., Fetter, J., Tecklenburg, M., Espe, M., Lerma, C., and Ferguson-Miller, S. (1992). Cytochrome *aa*₃ of *Rhodobacter sphaeroides* as a model for mitochondrial cytochrome *c* oxidase. Purification, kinetics, proton pumping, and spectral analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 267(34):24264–24272.

- Hosler, J. P. (2004). The influence of subunit III of cytochrome *c* oxidase on the D pathway, the proton exit pathway and mechanism-based inactivation in subunit I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:332–339.
- Hosler, J. P., Shapleigh, J. P., Mitchell, D. M., Kim, Y., Pressler, M. A., Georgiou, C., Babcock, G. T., Alben, J. O., Ferguson-Miller, S., and Gennis, R. B. (1996). Polar residues in helix VIII of subunit I of cytochrome *c* oxidase influence the activity and the structure of the active site. *Biochemistry*, 35(33):10776–10783.
- Hudson, J. M., Heffron, K., Kotlyar, V., Sher, Y., Maklashina, E., Cecchini, G., and Armstrong, F. A. (2005). Electron transfer and catalytic control by the iron-sulfur clusters in a respiratory enzyme, *E. coli* fumarate reductase. *Journal of the American Chemical Society*, 127(19):6977–6989.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T., and Michel, H. (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc*₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure with Folding & Design*, 8(6):669–684.
- Hunte, C., Palsdottir, H., and Trumpower, B. L. (2003). Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome *bc*₁ complex. *FEBS Letters*, 545(1):39–46.
- Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G., and Rees, D. C. (1999). Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*, 284(5422):1961–1966.
- Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Croal, L. R., Cecchini, G., and Rees, D. C. (2002). Crystallographic studies of the *Escherichia coli* quinol-fumarate reductase with inhibitors bound to the quinol-binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(18):16124–16130.
- Iwaki, M., Giotta, L., Akinku, A. O., Schägger, H., Fisher, N., Breton, J., and Rich, P. R. (2003). Redox-induced transitions in bovine cytochrome *bc*₁ complex studied by perfusion-induced ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry*, 42(38):11109–11119.
- Iwaki, M., Puustinen, A., Wikström, M., and Rich, P. R. (2004). ATR-FTIR spectroscopy and isotope labeling of the P_M intermediate of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 43(45):14370–14378.
- Iwaki, M., Yakovlev, G., Hirst, J., Osyczka, A., Dutton, P. L., Marshall, D., and Rich, P. R. (2005). Direct observation of redox-linked histidine protonation changes in the iron-sulfur protein of the cytochrome *bc*₁ complex by ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry*, 44(11):4230–4237.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 376(6542):660–669.
- Iyoda, M., Otsuka, H., Sato, K., Nisato, N., and Oda, K. (1990). Homocoupling of Aryl Halides Using Nickel(II) Complex and Zinc in the Presence of Et₄NI. An Efficient Method for the Synthesis of Biaryls and Bipyridines. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 63:80–87.
- Jackson, J. B. and Crofts, A. R. (1971). The Kinetics of Light Induced Carotenoid Changes in *Rhodospseudomonas sphaeroides* and their Relation to Electrical Field Generation across the Chromatophore Membrane. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 18(1):120–130.
- Janko, K. and Benz, R. (1977). Properties of lipid bilayer membranes made from lipids containing phytanic acid. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 470(1):8–16.
- Jasaitis, A., Rappaport, F., Pilet, E., Liebl, U., and Vos, M. H. (2005). Activationless electron transfer through the hydrophobic core of cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31):10882–10886.

- Jasaitis, A., Verkhovsky, M., Morgan, J., Verkhovskaya, M., and Wikström, M. (1999). Assignment and charge translocation stoichiometries of the major electrogenic phases in the reaction of cytochrome *c* oxidase with dioxygen. *Biochemistry*, 38(9):2697–2706.
- Jeuken, L. J. C., Jones, A. K., Chapman, S. K., Cecchini, G., and Armstrong, F. A. (2002). Electron-transfer mechanisms through biological redox chains in multicenter enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 124(20):5702–5713.
- John, P. and Whatley, F. (1977). The Bioenergetics of *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 463:129–153.
- Jünemann, S., Heathcote, P., and Rich, P. R. (1998). On the Mechanism of Quinol Oxidation in the *bc*₁ Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34):21603–21607.
- Jünemann, S., Heathcote, P., and Rich, P. R. (2000). The reactions of hydrogen peroxide with bovine cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1456(1):56–66.
- Jünemann, S., Meunier, B., Gennis, R. B., and Rich, P. R. (1997). Effects of mutation of the conserved lysine-362 in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 36(47):14456–14464.
- Kagawa, Y. and Racker, E. (1971). Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 246(17):5477–5487.
- Kannt, A., Lancaster, C. R. D., and Michel, H. (1998a). The Coupling of Electron Transfer and Proton Translocation: Electrostatic Calculations on *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c* Oxidase. *Biophysical Journal*, 74(2):708–721.
- Kannt, A. and Michel, H. (2001). Bacterial cytochrome *c* oxidase. In Messerschmidt, A. and Huber, R. and Poulos, T. L., editors, *Handbook of Metalloproteins*, volume 1, pages 331–347. Wiley-VCH.
- Kannt, A., Ostermann, T., Muller, H., and Ruitenber, M. (2001). Zn²⁺ binding to the cytoplasmic side of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase selectively uncouples electron transfer and proton translocation. *FEBS Letters*, 503(2-3):142–146.
- Kannt, A., Pfitzner, U., Ruitenber, M., Hellwig, P., Ludwig, B., Mäntele, W., Fendler, K., and Michel, H. (1999). Mutation of Arg-54 Strongly Influences Heme Composition and Rate and Directionality of Electron Transfer in *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c* Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53):37974–37981.
- Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E., and Michel, H. (1998b). Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the *ba*₃-type cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters*, 434(1-2):17–22.
- Kaplan, J. H., Forbush, B. r., and Hoffman, J. F. (1978). Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry*, 17(10):1929–1935.
- Karpefors, M., Ädelroth, P., and Brzezinski, P. (2000a). Localized control of proton transfer through the D-pathway in cytochrome *c* oxidase: application of the proton-inventory technique. *Biochemistry*, 39(23):6850–6856.
- Karpefors, M., Ädelroth, P., and Brzezinski, P. (2000b). The onset of the deuterium isotope effect in cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 39(17):5045–5050.

- Kim, E., Chufan, E. E., Kamaraj, K., and Karlin, K. D. (2004). Synthetic Models for Heme-Copper Oxidases. *Chemical Reviews*, 104:1077–1133.
- Kim, J., Mao, J., and Gunner, M. (2005). Are Acidic and Basic Groups in Buried Proteins Predicted to be Ionized? *Journal of Molecular Biology*, 348(5):1283–1298.
- King, T., Yu, C. A., Yu, L., and Chiang, Y. (1975). An examination of the components, mechanism and their uncertainties involved in mitochondrial electron transport from succinate to Cytochrome *c*. In Quagliariello, E., Papa, S., Palmieri, F., Slater, E. C., and Sliprandi, N., editors, *Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation*, pages 105–118. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Kitagawa, Teizo & Ogura, T. (1997). Oxygen Activation at the binuclear site of Heme-Copper Oxydase Superfamily as revealed by Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy. *Progress in Inorganic Chemistry*, 45:431–479.
- Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A., and Michel, H. (1995). Engineered Fv fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes. *Bio/Technology*, 13(2):155–160.
- Klishin, S. S., Junge, W., and Mulkidjanian, A. Y. (2002). Flash-induced turnover of the cytochrome *bc*₁ complex in chromatophores of *Rhodobacter capsulatus*: binding of Zn²⁺ decelerates likewise the oxidation of cytochrome *b*, the reduction of cytochrome *c*₁ and the voltage generation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(3):177–182.
- Kobayashi, K., Une, H., and Hayashi, K. (1989). Electron transfer process in cytochrome oxidase after pulse radiolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(14):7976–7980.
- Kolling, D. R. J., Samoilova, R. I., Holland, J. T., Berry, E. A., Dikanov, S. A., and Crofts, A. R. (2003). Exploration of Ligands to the Q_i Site Semiquinone in the *bc*₁ Complex Using High-resolution EPR. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41):39747–39754.
- König, P., Ghosh, N., Hoffmann, B., Elstner, M., Tajkhorshid, E., Frauenheim, T., and Cui, Q. (2006). Toward Theoretical Analysis of Long-Range Proton Transfer Kinetics in Biomolecular Pumps. *Journal of Physical Chemistry A*, 110:548–563.
- Konstantinov, A. A., Capitanio, N., Vygodina, T. V., and Papa, S. (1992). pH changes associated with cytochrome *c* oxidase reaction with H₂O₂ Protonation state of the peroxy and oxoferryl intermediates. *FEBS Letters*, 312(1):71–74.
- Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., and Gennis, R. B. (1997). The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17):9085–9090.
- Kornyshev, A. A., Kuznetsov, A. M., Spohr, E., and Ulstrup, J. (2003). Kinetics of proton transport in water. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(15):3351–3366.
- Krause, R. (1977). Synthesis of Mixed Complexes of Ruthenium(II) with 2,2'-Dipyridyl. *Inorganica Chimica Acta*, 22:209–213.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Unden, G., and Lancaster, C. R. D. (2002). Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(1-2):23–38.

- Kröger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F., and Lenger, R. (1992). Bacterial fumarate respiration. *Archives of Microbiology*, 158:311–314.
- Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003). Structure of the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, 302(5647):1009–1014.
- Kurnikov, I. V. and Beratan, D. N. (1996). Ab initio based effective Hamiltonians for long-range electron transfer: Hartree–Fock analysis. *The Journal of Chemical Physics*, 105(21):9561–9573.
- Lambeth, D. O. and Palmer, G. (1973). The Kinetics and Mechanism of Reduction of Electron Transfer Proteins and Other Compounds of Biological Interest by Dithionite. *Journal of Biological Chemistry*, 248(17):6095–6103.
- Lancaster, C. R. (2001). Succinate:quinone-oxidoreductases. In Messerschmidt, A. and Huber, R. and Poulos, T. L., editors, *Handbook of Metalloproteins*, volume 1, pages 379–401. Wiley-VCH.
- Lancaster, C. R., Kröger, A., Auer, M., and Michel, H. (1999). Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature*, 402(6760):377–385.
- Lancaster, C. R. D. (2002a). *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase–2.2 Å resolution crystal structure and the E-pathway hypothesis of coupled transmembrane proton and electron transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1565(2):215–231.
- Lancaster, C. R. D. (2002b). Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(1-2):1–6.
- Lancaster, C. R. D., Gross, R., Haas, A., Ritter, M., Mäntele, W., Simon, J., and Kröger, A. (2000). Essential role of Glu-C66 for menaquinol oxidation indicates transmembrane electrochemical potential generation by *Wolinella succinogenes* fumarate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24):13051–13056.
- Lancaster, C. R. D., Gross, R., and Simon, J. (2001). A third crystal form of *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase reveals domain closure at the site of fumarate reduction. *European Journal of Biochemistry*, 268(6):1820–1827.
- Lancaster, C. R. D. and Simon, J. (2002). Succinate:quinone oxidoreductases from ϵ -proteobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553(1-2):84–101.
- Lange, C. and Hunte, C. (2002). Crystal structure of the yeast cytochrome bc_1 complex with its bound substrate Cytochrome c . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5):2800–2805.
- Lange, C., Nett, J. H., Trumpower, B. L., and Hunte, C. (2001). Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc_1 complex structure. *The EMBO Journal*, 20(23):6591–6600.
- Lawaczeck, R. (1988). Defect structures in membranes: routes for permeation of small molecules. *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, 92:961–963.
- Lemma, E., Hagerhall, C., Geisler, V., Brandt, U., von Jagow, G., and Kröger, A. (1991). Reactivity of the *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex with quinones. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1059(3):281–285.
- Leung, K. H. and Hinkle, P. C. (1975). Reconstitution of ion transport and respiratory control in vesicles formed from reduced coenzyme Q-cytochrome c reductase and phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 250(21):8467–8471.

- Levesque, S., Thibault, J., Castonguay, M., C.-Gaudreault, R., and Laroche, G. (2002). Modification of lipid transport through a microporous PTFE membrane wall grafted with poly(ethylene glycol). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25(3):205–217.
- Lind, C., Cadenas, E., Hochstein, P., and Ernster, L. (1990). DT-Diaphorase: purification, properties, and function. *Methods In Enzymology*, 186:287–301.
- Link, T. A. (1997). The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q_P) site of the cytochrome bc_1 complex: The 'proton-gated affinity change' mechanism. *FEBS Letters*, 412(2):257–264.
- Link, T. A. (2001). Cytochrome bc_1 complex. In Messerschmidt, A. and Huber, R. and Poulos, T. L., editors, *Handbook of Metalloproteins*, volume 1, pages 402–423. Wiley-VCH.
- Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Huttemann, M., Lee, I., and Kadenbach, B. (2001). Cytochrome c oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *ChemBioChem*, 2(6):392–403.
- Ludwig, B. and Schatz, G. (1980). A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa_3) from *Paracoccus denitrificans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1):196–200.
- Lumsdon, S. O., Green, J., and Stieglitz, B. (2005). Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(4):172–178.
- MacMillan, F., Budiman, K., Angerer, H., and Michel, H. (2006). The role of tryptophan 272 in the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. *FEBS Letters*, 580(5):1345–1349.
- MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T., and Michel, H. (1999). Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 38(29):9179–9184.
- Maneg, O., Malatesta, F., Ludwig, B., and Drosou, V. (2004). Interaction of cytochrome c with cytochrome oxidase: two different docking scenarios. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:274–281.
- Marchal, D., Boireau, W., Laval, J. M., Moiroux, J., and Bourdillon, C. (1998). Electrochemical Measurement of Lateral Diffusion Coefficients of Ubiquinones and Plastoquinones of Various Isoprenoid Chain Lengths Incorporated in Model Bilayers. *Biophysical Journal*, 74(4):1937–1948.
- Marcus, R. A. (1964). Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory. *Annual Review of Physical Chemistry*, 15(1):155–196.
- Marcus, R. A. and Sutin, N. (1985). Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 811:265–322.
- Marx, D., Tuckerman, M. E., Hutter, J., and Parrinello, M. (1999). The nature of the hydrated excess proton in water. *Nature*, 397(6720):601–604.
- Matysik, J., Hildebrandt, P., and Ludwig, B. (2000). Induction of photochemical auto-reduction of cytochrome c oxidase by an organic peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1459(1):125–130.
- Mayer, J. M. and Rhile, I. J. (2004). Thermodynamics and kinetics of proton-coupled electron transfer: stepwise vs. concerted pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:51–58.

- McCray, J. A., Herbette, L., Kihara, T., and Trentham, D. R. (1980). A New Approach to Time-Resolved Studies of ATP-Requiring Biological Systems: Laser Flash Photolysis of Caged ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12):7237–7241.
- Medvedev, D., Medvedev, E., Kotelnikov, A., and Stuchebrukhov, A. (2005). Analysis of the kinetics of the membrane potential generated by cytochrome *c* oxidase upon single electron injection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1710(1):47–56.
- Medvedev, D. M., Daizadeh, I., and Stuchebrukhov, A. A. (2000). Electron transfer tunneling pathways in bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 122(28):6571–6582.
- Meinhardt, S. W. and Crofts, A. R. (1982). Kinetic and thermodynamic resolution of cytochrome *c*₁ and cytochrome *c*₂ from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *FEBS Letters*, 149(2):223–227.
- Messner, K. R. and Imlay, J. A. (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45):42563–42571.
- Michel, H. (1998). The mechanism of proton pumping by cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22):12819–12824.
- Michel, H. (1999). Cytochrome *c* oxidase: Catalytic cycle and mechanisms of proton pumping-A discussion. *Biochemistry*, 38(46):15129–15140.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., and Kannt, A. (1998). Cytochrome *c* Oxidase: Structure and Spectroscopy. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27:329–356.
- Milburn, T., Matsubara, N., Billington, A. P., Udgaonkar, J. B., Walker, J. W., Carpenter, B. K., Webb, W. W., Marque, J., Denk, W., and McCray et, a. (1989). Synthesis, photochemistry, and biological activity of a caged photolabile acetylcholine receptor ligand. *Biochemistry*, 28(1):49–55.
- Mileni, M., Haas, A., Mäntele, W., Simon, J., and Lancaster, C. R. (2005). Probing Heme Propionate Involvement in Transmembrane Proton Transfer Coupled to Electron Transfer in Dihemic Quinol:Fumarate Reductase by ¹³C-Labeling and FTIR Difference Spectroscopy. *Biochemistry*, 44:16718–16728.
- Millett, F. and Durham, B. (2002). Design of photoactive ruthenium complexes to study interprotein electron transfer. *Biochemistry*, 41(38):11315–11324.
- Millett, F. and Durham, B. (2004). Kinetics of Electron Transfer within Cytochrome *bc*₁ and Between Cytochrome *bc*₁ and Cytochrome *c*. *Photosynthesis Research*, 82(1):1–16.
- Mills, D. A. and Ferguson-Miller, S. (2003). Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome *c* oxidase: lessons from other proteins. *FEBS Letters*, 545(1):47–51.
- Mills, D. A., Geren, L., Hiser, C., Schmidt, B., Durham, B., Millett, F., and Ferguson-Miller, S. (2005). An arginine to lysine mutation in the vicinity of the heme propionates affects the redox potentials of the hemes and associated electron and proton transfer in cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 44(31):10457–10465.
- Mills, D. A. and Hosler, J. P. (2005). Slow Proton Transfer through the Pathways for Pumped Protons in Cytochrome *c* Oxidase Induces Suicide Inactivation of the Enzyme. *Biochemistry*, 44(12):4656–4666.

- Mitchell, D. M., Aasa, R., Ådelroth, P., Brzezinski, P., Gennis, R. B., and Malmström, B. G. (1995). EPR studies of wild-type and several mutants of cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*: Glu286 is not a bridging ligand in the cytochrome a_3 -Cu_B center. *FEBS Letters*, 374(3):371–374.
- Mitchell, D. M., Muller, J. D., Gennis, R. B., and Nienhaus, G. U. (1996a). FTIR study of conformational substates in the CO adduct of cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 35(51):16782–16788.
- Mitchell, D. M., Shapleigh, J. P., Archer, A. M., Alben, J. O., and Gennis, R. B. (1996b). A pH-dependent polarity change at the binuclear center of reduced cytochrome *c* oxidase detected by FTIR difference spectroscopy of the CO adduct. *Biochemistry*, 35(29):9446–9450.
- Mitchell, P. (1975). Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *bc*₁ complex in the respiratory chain: Protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Letters*, 56(1):1–6.
- Mitchell, P. (1979). Compartmentation and Communication in Living Systems. Ligand Conduction: a General Catalytic Principle in Chemical, Osmotic and Chemiosmotic Reaction Systems. *European Journal of Biochemistry*, 95(1):1–20.
- Mitchell, R., Brown, S., Mitchell, P., and Rich, P. R. (1992a). Rates of cyanide binding to the catalytic intermediates of mammalian cytochrome *c* oxidase, and the effects of Cytochrome *c* and poly(L-lysine). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1100(1):40–48.
- Mitchell, R., Mitchell, P., and Rich, P. R. (1992b). Protonation states of the catalytic intermediates of cytochrome *c* oxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1101(2):188–191.
- Moody, A. J. (1996). As prepared forms of fully oxidised haem/Cu terminal oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1276(1):6–20.
- Moody, A. J., Brandt, U., and Rich, P. R. (1991a). Single electron reduction of 'slow' and 'fast' cytochrome-*c* oxidase. *FEBS Letters*, 293(1-2):101–105.
- Moody, A. J., Butler, C. S., Watmough, N. J., Thomson, A. J., and Rich, P. R. (1998). The Reaction of Halides with Pulsed Cytochrome *bo* from *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 331(Part 2):459–464.
- Moody, A. J., Cooper, C. E., Gennis, R. B., Rumbley, J. N., and Rich, P. R. (1995). Interconversion of fast and slow forms of cytochrome *bo* from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 34(20):6838–6846.
- Moody, A. J., Cooper, C. E., and Rich, P. R. (1991b). Characterisation of 'fast' and 'slow' forms of bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1059(2):189–207.
- Moran, D. B., Morton, G. O., and Albright, J. D. (1986). Synthesis of (Pyridinyl)-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyridines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 23:1071–1077.
- Morgan, J. E., Li, P. M., Jang, D. J., el Sayed, M. A., and Chan, S. I. (1989). Electron transfer between cytochrome *a* and copper A in cytochrome *c* oxidase: a perturbed equilibrium study. *Biochemistry*, 28(17):6975–6983.
- Moser, C., Page, C., Farid, R., and Dutton, P. (1995). Biological Electron Transfer. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 27(3):263–274.
- Moser, C. C., Keske, J., Warncke, K., Farid, R., and Dutton, P. L. (1992). The Nature of Biological Electron Transfer. *Nature*, 355:796–802.
- Mulkidjanian, A. Y. (2005). Ubiquinol oxidation in the cytochrome *bc*₁ complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1709(1):5–34.

- Mulkidjanian, A. Y., Heberle, J., and Cherepanov, D. A. (2006). Protons at interfaces: Implications for biological energy conversion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, In Press, Corrected Proof.
- Mulkidjanian, A. Y. and Junge, W. (1994). Calibration and time resolution of luminal pH-transients in chromatophores of *Rhodobacter capsulatus* following a single turnover flash of light: Proton release by the cytochrome *bc*₁-complex is strongly electrogenic. *FEBS Letters*, 353(2):189–193.
- Mulkidjanian, A. Y. and Junge, W. (1995). Electrogenic Proton Displacements in the Cytochrome *bc*₁-Complex of *Rhodobacter capsulatus*. In Mathis, P., editor, *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, volume 2, pages 547–550. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mulkidjanian, A. Y., Mamedov, M. D., and Drachev, L. A. (1991). Slow electrogenic events in the cytochrome *bc*₁-complex of *Rhodobacter sphaeroides* The electron transfer between cytochrome *b* hemes can be non-electrogenic. *FEBS Letters*, 284(2):227–231.
- Mulkidjanian, A. Y., Mamedov, M. D., Semenov, A. Y., Shinkarev, V. P., Verkhovsky, M. I., and Drachev, L. A. (1990). Partial reversion of the electrogenic reaction in the ubiquinol : Cytochrome *c*₂-oxidoreductase of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores under neutral and alkaline conditions. *FEBS Letters*, 277(1-2):127–130.
- Muller, F., Crofts, A. R., and Kramer, D. M. (2002). Multiple Q-cycle bypass reactions at the Q_o site of the cytochrome *bc*₁ complex. *Biochemistry*, 41(25):7866–7874.
- Muller, F. L., Roberts, A. G., Bowman, M. K., and Kramer, D. M. (2003). Architecture of the Q_o site of the cytochrome *bc*₁ complex probed by superoxide production. *Biochemistry*, 42(21):6493–6499.
- Müller, M., Thelen, M., O’Shea, P., and Azzi, A. (1986). Functional reconstitution of proton-pumping cytochrome-*c* oxidase in phospholipid vesicles. *Methods In Enzymology*, 126:78–87.
- Nagle, J. F. and Morowitz, H. J. (1978). Molecular Mechanisms for Proton Transport in Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(1):298–302.
- Namslauer, A. and Brzezinski, P. (2004). Structural elements involved in electron-coupled proton transfer in cytochrome *c* oxidase. *FEBS Letters*, 567(1):103–110.
- Namslauer, A., Pawate, A. S., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2003). Redox-coupled proton translocation in biological systems: Proton shuttling in cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26):15543–15547.
- Naqui, A., Kumar, C., Ching, Y. C., Powers, L., and Chance, B. (1984). Structure and reactivity of multiple forms of cytochrome oxidase as evaluated by X-ray absorption spectroscopy and kinetics of cyanide binding. *Biochemistry*, 23(25):6222–6227.
- Neises, B. and Steglich, W. (1985). Esterification of Carboxylic Acids with Dicyclohexyl-Carbodiimide/4-Dimethylaminopyridine: tert-Butyl Ethyl fumarate. *Organic Synthesis*, 63:183–187.
- Nicholls, P. and Chanady, G. A. (1981). Interactions of cytochrome *aa*₃ with oxygen and carbon monoxide. The role of the 607 nm complex. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 634(2):256–265.
- Nicholls, P. and Soulimane, T. (2004). The mixed valence state of the oxidase binuclear centre: how *Thermus thermophilus* cytochrome *ba*₃ differs from classical *aa*₃ in the aerobic steady state and when inhibited by cyanide. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1655(1-3):381–387.

- Nilsson, T. (1992). Photoinduced electron transfer from tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium to cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14):6497–6501.
- Niu, L., Gee, K. R., Schaper, K., and Hess, G. P. (1996). Synthesis and photochemical properties of a kainate precursor and activation of kainate and AMPA receptor channels on a microsecond time scale. *Biochemistry*, 35(6):2030–2036.
- Nyquist, R. M., Heitbrink, D., Bolwien, C., Gennis, R. B., and Heberle, J. (2003). Direct observation of protonation reactions during the catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15):8715–8720.
- Oda, K., Ogura, T., Appelman, E. H., and Yoshikawa, S. (2004). The intrinsic stability of the second intermediate following the dioxygen-bound form in the O₂ reduction by cytochrome *c* oxidase. *FEBS Letters*, 570(1-3):161–165.
- Ohnishi, T., Moser, C. C., Page, C. C., Dutton, P. L., and Yano, T. (2000). Simple redox-linked proton-transfer design: new insights from structures of quinol-fumarate reductase. *Structure with Folding & Design*, 8(2):R23–R32.
- Oliveberg, M., Brzezinski, P., and Malmström, B. G. (1989). The effect of pH and temperature on the reaction of fully reduced and mixed-valence cytochrome *c* oxidase with dioxygen. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 977(3):322–328.
- Oliveberg, M. and Malmström, B. G. (1991). Internal electron transfer in cytochrome *c* oxidase: evidence for a rapid equilibrium between cytochrome *a* and the bimetallic site. *Biochemistry*, 30(29):7053–7057.
- Olkhova, E., Helms, V., and Michel, H. (2005). Titration Behavior of Residues at the Entrance of the D-Pathway of Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans* Investigated by Continuum Electrostatic Calculations. *Biophysical Journal*, 89(4):2324–2331.
- Olkhova, E., Hutter, M. C., Lill, M. A., Helms, V., and Michel, H. (2004). Dynamic Water Networks in Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans* Investigated by Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal*, 86(4):1873–1889.
- Olsson, M. H., Sharma, P. K., and Warshel, A. (2005). Simulating redox coupled proton transfer in cytochrome *c* oxidase: Looking for the proton bottleneck. *FEBS Letters*, 579(10):2026–2034.
- Olsson, M. H. M. and Warshel, A. (2006). Monte Carlo simulations of proton pumps: On the working principles of the biological valve that controls proton pumping in cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17):6500–6505.
- Onuchic, J. N., Beratan, D. N., Winkler, J. R., and Gray, H. B. (1992). Pathway Analysis of Protein Electron-Transfer Reactions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 21(1):349–377.
- O'Reilly, J. E. (1973). Oxidation-reduction potential of the ferro-ferricyanide system in buffer solutions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 292(3):509–515.
- Oster, G. and Wang, H. (2003). Rotary protein motors. *Trends in Cell Biology*, 13(3):114–121.
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., and Michel, H. (1997). Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome *c* oxidase complexed with an antibody F_v fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20):10547–10553.

- Osyczka, A., Moser, C. C., Daldal, F., and Dutton, P. L. (2004). Reversible redox energy coupling in electron transfer chains. *Nature*, 427(6975):607–612.
- Osyczka, A., Moser, C. C., and Dutton, P. L. (2005). Fixing the Q cycle. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(4):176–182.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. X., and Dutton, P. L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature*, 402(6757):47–52.
- Palsdottir, H. and Hunte, C. (2003). Purification of the cytochrome bc₁ complex from yeast. In Hunte, C., Schägger, H., and von Jagow, G., editors, *Membrane Protein Purification and Crystallization*, Membrane Protein Purification and Crystallization., pages 191–203. Academic Press/Elsevier Science, San Diego, CA, U.S.A, 2 edition.
- Palsdottir, H., Lojero, C. G., Trumpower, B. L., and Hunte, C. (2003). Structure of the Yeast Cytochrome bc₁ Complex with a Hydroxyquinone Anion Q_o Site Inhibitor Bound. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33):31303–31311.
- Pan, L. P., Hibdon, S., Liu, R. Q., Durham, B., and Millett, F. (1993). Intracomplex electron transfer between ruthenium-cytochrome *c* derivatives and cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 32(33):8492–8498.
- Panda, M. and Robinson, N. C. (1995). Kinetics and mechanism for the binding of HCN to cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 34(31):10009–10018.
- Papa, S. (2005). Role of cooperative H⁺/e⁻ Linkage (redox Bohr effect) at heme *a*/Cu_A and heme *a*₃/Cu_B in the proton pump of cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2):178–186.
- Papadopoulos, P. G., Walter, S. A., Li, J. W., and Baker, G. M. (1991). Proton interactions in the resting form of cytochrome oxidase. *Biochemistry*, 30(3):840–850.
- Parul, D., Palmer, G., and Fabian, M. (2005). Proton interactions with hemes *a* and *a*₃ in bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 44(11):4562–4571.
- Paula, S., Volkov, A., Van Hoek, A., Haines, T., and Deamer, D. (1996). Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophysical Journal*, 70(1):339–348.
- Pawate, A. S., Morgan, J., Namslawer, A., Mills, D., Brzezinski, P., Ferguson-Miller, S., and Gennis, R. B. (2002). A mutation in subunit I of cytochrome oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* results in an increase in steady-state activity but completely eliminates proton pumping. *Biochemistry*, 41(45):13417–13423.
- Pazur, J. H. and Kleppe, K. (1964). The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry*, 35:578–583.
- Pecoraro, C., Gennis, R. B., Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (2001). Role of the K-channel in the pH-dependence of the reaction of cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 40(32):9695–9708.
- Petty, K., Jackson, J. B., and Dutton, P. L. (1979). Factors controlling the binding of two protons per electron transferred through the ubiquinone and cytochrome *b*/*c*₂ segment of *Rhodopseudomonas sphaeroides* chromatophores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 546(1):17–42.
- Petty, K. M., Jackson, J. B., and Dutton, P. L. (1977). Kinetics and stoichiometry of proton binding in *Rhodopseudomonas sphaeroides* chromatophores. *FEBS Letters*, 84(2):299–303.

- Pfützner, U., Hoffmeier, K., Harrenga, A., Kannt, A., Michel, H., Bamberg, E., Richter, O.-M., and Ludwig, B. (2000). Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*, 39(23):6756–6762.
- Pfützner, U., Kirichenko, A., Konstantinov, A. A., Mertens, M., Wittershagen, A., Kolbesen, B. O., Steffens, G. C., Harrenga, A., Michel, H., and Ludwig, B. (1999). Mutations in the Ca^{2+} binding site of the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase. *FEBS Letters*, 456(3):365–369.
- Pfützner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B., and Richter, O. M. (1998). Cytochrome *c* oxidase (Heme *aa*₃) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 30(1):89–97.
- Pilet, E., Jasaitis, A., Liebl, U., and Vos, M. H. (2004). Electron transfer between hemes in mammalian cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(46):16198–16203.
- Pintschovius, J. and Fendler, K. (1999). Charge translocation by the Na^+/K^+ -ATPase investigated on solid supported membranes: rapid solution exchange with a new technique. *Biophysical Journal*, 76(2):814–826.
- Pomès, R. and Roux, B. (2002). Molecular Mechanism of H^+ Conduction in the Single-File Water Chain of the Gramicidin Channel. *Biophysical Journal*, 82(5):2304–2316.
- Popović, D. M., Quenneville, J., and Stuchebrukhov, A. A. (2005). DFT/electrostatic calculations of pK_a values in cytochrome *c* oxidase. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(8):3616–3626.
- Popović, D. M. and Stuchebrukhov, A. A. (2004a). Electrostatic Study of the Proton Pumping Mechanism in Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 126:1858–1871.
- Popović, D. M. and Stuchebrukhov, A. A. (2004b). Proton pumping mechanism and catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase: Coulomb pump model with kinetic gating. *FEBS Letters*, 566(1-3):126–130.
- Popović, D. M. and Stuchebrukhov, A. A. (2005). Proton exit channels in bovine cytochrome *c* oxidase. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(5):1999–2006.
- Powers, L., Lauraeus, M., Reddy, K. S., Chance, B., and Wikström, M. (1994). Structure of the binuclear heme iron-copper site in the quinol-oxidizing cytochrome *aa*₃ from *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1183(3):504–512.
- Prince, R. C., Bashford, C. L., Takamiya, K. I., van den Berg, W. H., and Dutton, P. L. (1978). Second order kinetics of the reduction of cytochrome *c*₂ by the ubiquinone cytochrome *b/c*₂ oxidoreductase of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry*, 253(12):4137–4142.
- Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T. (1996). Resonance Raman/absorption characterization of the oxo intermediates of cytochrome *c* oxidase generated in its reaction with hydrogen peroxide: pH and H_2O_2 concentration dependence. *Biochemistry*, 35(26):8580–8586.
- Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., and Babcock, G. T. (1998). Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14):8020–8025.
- Puustinen, A. and Wikström, M. (1999). Proton exit from the heme-copper oxidase of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(1):35–37.

- Quenneville, J., Popović, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2004). Redox-Dependent pK_A of Cu_B Histidine Ligand in Cytochrome *c* Oxidase. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:18383–18389.
- Quenneville, J., Popović, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2006). Combined DFT and electrostatics study of the proton pumping mechanism in cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, In Press, Corrected Proof.
- Ramesh, D., Wieboldt, R., Billington, A., Carpenter, B., and Hess, G. (1993). Photolabile Precursors of Biological Amides: Synthesis and Characterization of caged o-Nitrobenzyl Derivatives of Glutamine, Asparagine, Glycinamide, and γ -Aminobutyramide. *Journal of Organic Chemistry*, 58:4599–4605.
- Randall, D. W., Gamelin, D. R., LaCroix, L. B., and Solomon, E. I. (2000). Electronic structure contributions to electron transfer in blue Cu and Cu_A . *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(1):16–29.
- Regan, J. J., Ramirez, B. E., Winkler, J. R., Gray, H. B., and Malmström, B. G. (1998). Pathways for electron tunneling in cytochrome *c* oxidase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 30(1):35–39.
- Ribacka, C., Verkhovskaya, M. L., Belevich, I., Bloch, D. A., Puustein, A., and Wikström, M. (2005). An Elementary Reaction Step of the Proton Pump Is Revealed by Mutation of Tryptophan-164 to Phenylalanine in Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*, 44:16502–16512.
- Rich, P. R. (1984). Electron and proton transfers through quinones and cytochrome *bc* complexes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 768(1):53–79.
- Rich, P. R. (1995). Towards an Understanding of the Chemistry of Oxygen Reduction. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22(3):479–486.
- Rich, P. R. (2004). The quinone chemistry of *bc* complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1658(1-2):165–171.
- Rich, P. R. and Bendall, D. S. (1979). A mechanism for the reduction of cytochromes by quinols in solution and its relevance to biological electron transfer reactions. *FEBS Letters*, 105(2):189–194.
- Rich, P. R. and Breton, J. (2001). FTIR studies of the CO and cyanide adducts of fully reduced bovine cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 40(21):6441–6449.
- Rich, P. R. and Clarke, S. D. (1982). Reconstitution of cytochrome *bc*₁ complex into lipid vesicles and the restoration of uncoupler sensitivity. *FEBS Letters*, 148(1):54–58.
- Rich, P. R. and Harper, R. (1990). Partition coefficients of quinones and hydroquinones and their relation to biochemical reactivity. *FEBS Letters*, 269(1):139–144.
- Rich, P. R., Jünemann, S., and Meunier, B. (1998). Protonmotive mechanism of heme-copper oxidases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 30(1):131–138.
- Rich, P. R., Rigby, S. E. J., and Heathcote, P. (2002). Radicals associated with the catalytic intermediates of bovine cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1554(3):137–146.
- Richter, O.-M. H., Dürr, K. L., Kannt, A., Ludwig, B., Scandurra, F. M., Giuffré, A., Sarti, P., and Hellwig, P. (2005). Probing the access of protons to the K pathway in the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase. *FEBS J*, 272(2):404–412.

- Richter, O.-M. H. and Ludwig, B. (2003). Cytochrome *c* oxidase-structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Reviews Of Physiology, Biochemistry And Pharmacology*, 147:47–74.
- Rillema, D. P., Allen, G., Meyer, T., and Conrad, D. (1983). Redox Properties of Ruthenium(II) Tris Chelate Complexes Containing the Ligands 2,2'-Bipyrazine, 2,2'-Bipyridine, and 2,2'-Bipyrimidine. *Inorganic Chemistry*, 22:1617–1622.
- Robinson, R. and Stokes, R. (1959). *Electrolyte Solutions*. Butterworths, London, 2nd edition.
- Rost, B., Behr, J., Hellwig, P., Richter, O. M., Ludwig, B., Michel, H., and Mäntele, W. (1999). Time-resolved FT-IR studies on the CO adduct of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase: comparison of the fully reduced and the mixed valence form. *Biochemistry*, 38(23):7565–7571.
- Roundhill, D. (1994). *Photochemistry and Photophysics of Metal Complexes*, chapter 5, pages 165–215. Modern Inorganic Chemistry. Kluwer Academic Publisher.
- Ruitenbergh, M. (2001). *Elektronen- und Protonentransport der Cytochrom-c-Oxidase aus Paracoccus denitrificans*. Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.
- Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Fendler, K., and Michel, H. (2002). Reduction of cytochrome *c* oxidase by a second electron leads to proton translocation. *Nature*, 417(6884):99–102.
- Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H., and Fendler, K. (2000). Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9):4632–4636.
- Sadoski, R. C., Engstrom, G., Tian, H., Zhang, L., Yu, C. A., Yu, L., Durham, B., and Millett, F. (2000). Use of a photoactivated ruthenium dimer complex to measure electron transfer between the Rieske iron-sulfur protein and Cytochrome *c*₁ in the cytochrome *bc*₁ complex. *Biochemistry*, 39(15):4231–4236.
- Salerno, J., Xu, Y., Osgood, M., Kim, C., and King, T. (1989). Thermodynamic and spectroscopic characteristics of the cytochrome *bc*₁ complex. Role of quinone in the behavior of cytochrome b562. *Journal of Biological Chemistry*, 264(26):15398–15403.
- Salomonsson, L., Faxén, K., Ädelroth, P., and Brzezinski, P. (2005). The timing of proton migration in membrane-reconstituted cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49):17624–17629.
- Schirawski, J. and Udden, G. (1998). Menaquinone-dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential. *European Journal Of Biochemistry / FEBS*, 257(1):210–215.
- Schmidt, B., McCracken, J., and Ferguson-Miller, S. (2003). A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:15539–15542.
- Schnorpfeil, M., Janausch, I. G., Biel, S., Kröger, A., and Udden, G. (2001). Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as a fumarate reductase. *European Journal Of Biochemistry / FEBS*, 268(10):3069–3074.
- Schultz, B. E. and Chan, S. I. (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, 30:23–65.

- Schutz, C. N. and Warshel, A. (2001). What are the dielectric „constants“ of proteins and how to validate electrostatic models? *Proteins*, 44(4):400–417.
- Schwörer, M. and Wirz, J. (2001). Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds in Solution, I. 2-Nitrotoluene: Thermodynamic and Kinetic Parameters of the *aci*-Nitro Tautomer. *Helvetica Chimica Acta*, 84(6):1441–1458.
- Seibold, S. A., Mills, D. A., Ferguson-Miller, S., and Cukier, R. I. (2005). Water chain formation and possible proton pumping routes in *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase: a molecular dynamics comparison of the wild type and R481K mutant. *Biochemistry*, 44(31):10475–10485.
- Shembekar, V. R., Chen, Y., Carpenter, B. K., and Hess, G. P. (2005). A protecting group for carboxylic acids that can be photolyzed by visible light. *Biochemistry*, 44(19):7107–7114.
- Shinkarev, V. P., Crofts, A. R., and Wraight, C. A. (2001). The Electric Field Generated by Photosynthetic Reaction Center Induces Rapid Reversed Electron Transfer in the *bc*₁ Complex. *Biochemistry*, 40(42):12584–12590.
- Siedow, J. N., Power, S., de la Rosa, F. F., and Palmer, G. (1978). The preparation and characterization of highly purified, enzymically active complex III from baker’s yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 253(7):2392–2399.
- Siegbahn, P. E. M., Blomberg, M. R. A., and Blomberg, M. L. (2003). Theoretical study of the energetics of proton pumping and oxygen reduction in cytochrome oxidase. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(39):10946–10955.
- Sigfridsson, E., Olsson, M. H., and Ryde, U. (2001). A Comparison of the Inner-Sphere Reorganization Energies of Cytochromes, Iron-Sulfur Clusters, and Blue Copper Proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:5546–5552.
- Sigurdson, H., Bränden, M., Namslauer, A., and Brzezinski, P. (2002). Ligand binding reveals protonation events at the active site of cytochrome *c* oxidase; is the K-pathway used for the transfer of H⁺ or OH[−]? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88(3-4):335–342.
- Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999a). Resolution of Electrogenic Steps Coupled to Conversion of Cytochrome *c* Oxidase from the Peroxy to the Ferryl-Oxo State. *Biochemistry*, 38(15):4853–4861.
- Siletsky, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vygodina, T. V., Buse, G., Kaulen, A., and Konstantinov, A. (1999b). Time-resolved generation of a membrane potential by *ba*₃ cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*; Evidence for reduction-induced opening of the binuclear center. *FEBS Letters*, 457(1):98–102.
- Siletsky, S. A., Pawate, A. S., Weiss, K., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2004). Transmembrane Charge Separation during the Ferryl-oxo → Oxidized Transition in a Nonpumping Mutant of Cytochrome *c* Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50):52558–52565.
- Snozzi, M. and Crofts, A. R. (1984). Electron transport in chromatophores from *Rhodospseudomonas sphaeroides* GA fused with liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 766(2):451–463.
- Snyder, C. and Trumpower, B. L. (1998). Mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome *bc*₁ complex: pre-steady-state kinetics of cytochrome *bc*₁ complexes containing site-directed mutants of the Rieske iron-sulfur protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1365(1-2):125–134.

- Snyder, C. H., Gutierrez-Cirlos, E. B., and Trumpower, B. L. (2000). Evidence for a concerted mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome *bc*₁ complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18):13535–13541.
- Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000). Structure and mechanism of the aberrant *ba*₃-cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.*, 19(8):1766–1776.
- Steel, P. J. and Constable, E. C. (1990). Synthesis, Spectroscopy, and Electrochemistry of Homo- and Heteroleptic Ruthenium(II)-Complexes of New Pyrazole containing Bidentate Ligands. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (4):1389–.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L., and Picot, D. (2003). An atypical haem in the cytochrome *b*₆*f* complex. *Nature*, 426(6965):413–418.
- Sullivan, B. P., Salmon, D., and Meyer, T. L. (1978). Mixed Phosphine 2,2'-Bipyridine Complexes of Ruthenium. *Inorganic Chemistry*, 17(12):3334–3341.
- Surerus, K. K., Oertling, W. A., Fan, C., Gurbiel, R. J., Einarsdottir, O., Antholine, W. E., Dyer, R. B., Hoffman, B. M., Woodruff, W. H., and Fee, J. A. (1992). Reaction of cyanide with cytochrome *ba*₃ from *Thermus thermophilus*: spectroscopic characterization of the Fe(II)*a*₃-CN·Cu(II)*B*-CN complex suggests four ¹⁴N atoms are coordinated to Cu_B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8):3195–3199.
- Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P., and Iwata, S. (2002). The X-ray Crystal Structures of Wild-type and EQ(I-286) Mutant Cytochrome *c* Oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Molecular Biology*, 321(2):329–339.
- Szundi, I., Cappuccio, J., and Einarsdóttir, O. (2004). Amplitude analysis of single-wavelength time-dependent absorption data does not support the conventional sequential mechanism for the reduction of dioxygen to water catalyzed by bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 43(50):15746–15758.
- Szundi, I., Liao, G. L., and Einarsdottir, O. (2001). Near-infrared time-resolved optical absorption studies of the reaction of fully reduced cytochrome *c* oxidase with dioxygen. *Biochemistry*, 40(8):2332–2339.
- Szundi, I., Van Eps, N., and Einarsdóttir, O. (2003). pH Dependence of the Reduction of Dioxygen to Water by Cytochrome *c* Oxidase. 2. Branched Electron Transfer Pathways Linked by Proton Transfer. *Biochemistry*, 42(17):5074–5090.
- Tan, M.-L., Balabin, I., and Onuchic, J. N. (2004). Dynamics of Electron Transfer Pathways in Cytochrome *c* Oxidase. *Biophysical Journal*, 86(3):1813–1819.
- Tepper, H. L. and Voth, G. A. (2005). Protons May Leak through Pure Lipid Bilayers via a Concerted Mechanism. *Biophysical Journal*, 88(5):3095–3108.
- Tittor, J., Soell, C., Oesterhelt, D., Butt, H., and Bamberg, E. (1989). A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96→Asn is fully reactivated by azide. *EMBO Journal*, 8(11):3477–3482.
- Tollin, G. (1995). Use of flavin photochemistry to probe intraprotein and interprotein electron transfer mechanisms. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 27(3):303–309.
- Tommos, C. and Babcock, G. T. (1998). Oxygen Production in Nature: a Light Driven Metallo-radical Enzyme Process. *Accounts of Chemical Research*, 31:18–25.

- Tomson, F. L., Morgan, J. E., Gu, G., Barquera, B., Vygodina, T. V., and Gennis, R. B. (2003). Substitutions for glutamate 101 in subunit II of cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* result in blocking the proton-conducting K-channel. *Biochemistry*, 42(6):1711–1717.
- Trumpower, B. L. (2002). A concerted, alternating sites mechanism of ubiquinol oxidation by the dimeric cytochrome *bc*₁ complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1555(1-3):166–173.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996). The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome *c* Oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(5265):1136–1144.
- Tsukihara, T., Shimokata, K., Katayama, Y., Shimada, H., Muramoto, K., Aoyama, H., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Yao, M., Ishimura, Y., and Yoshikawa, S. (2003). The low-spin heme of cytochrome *c* oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26):15304–15309.
- Uندن, G., Albracht, S., and Kröger, A. (1984). Redox Potentials and kinetic Properties of Fumarate Reductase Complex from *Vibrio succinogenes*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 767:460–469.
- Uندن, G., Hackenberg, H., and Kröger, A. (1980). Isolation and functional aspects of the fumarate reductase involved in the phosphorylative electron transport of *Vibrio succinogenes*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 591(2):275–288.
- Uندن, G. and Kröger, A. (1981). The function of the subunits of the fumarate reductase complex of *Vibrio succinogenes*. *European Journal Of Biochemistry / FEBS*, 120(3):577–584.
- Van Eps, N., Szundi, I., and Einarsdóttir, O. (2003). pH dependence of the reduction of dioxygen to water by cytochrome *c* oxidase. 1. The P_R state is a pH-dependent mixture of three intermediates, A, P, and F. *Biochemistry*, 42(17):5065–5073.
- Varotsis, C. and Babcock, G. T. (1990). Appearance of the $\nu(\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O})$ vibration from a ferryl-oxo intermediate in the cytochrome oxidase/dioxygen reaction. *Biochemistry*, 29(32):7357–7362.
- Venanzi, L. (1958). Tetrahedral Nickel(II) Complexes and the Factors Determining Their Formation. Part I. Bistriphenylphosphine Nickel(II) Compounds. *Journal of the Chemical Society*, pages 719–723.
- Verkhovsky, M., Tuukkanen, A., Backgren, C., Puustinen, A., and Wikström, M. (2001a). Charge Translocation Coupled to Electron Injection into Oxidized Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*, 40(24):7077–7083.
- Verkhovsky, M. I., Belevich, N., Morgan, J. E., and Wikstrom, M. (1999a). Proton linkage of cytochrome *a* oxidoreduction in carbon monoxide-treated cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1412(2):184–189.
- Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, J. E., and Wikström, M. (1999b). Proton translocation by cytochrome *c* oxidase. *Nature*, 400(6743):480–483.
- Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., and Wikström, M. (2001b). Ultrafast haem-haem electron transfer in cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1506(3):143–146.
- Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., and Wikström, M. (1995). Control of electron delivery to the oxygen reduction site of cytochrome *c* oxidase: a role for protons. *Biochemistry*, 34(22):7483–7491.
- Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., and Wikström, M. (1996). Redox transitions between oxygen intermediates in cytochrome-*c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22):12235–12239.

- Voth, G. (2006). Computer Simulation of Proton Solvation and Transport in Aqueous and Biomolecular Systems. *Accounts of Chemical Research*, 39:143–150.
- Vygodina, T. and Konstantinov, A. (1989). Effect of pH on the spectrum of cytochrome *c* oxidase hydrogen peroxide complex. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 973(3):390–398.
- Vygodina, T. V., Pecoraro, C., Mitchell, D., Gennis, R., and Konstantinov, A. A. (1998). Mechanism of inhibition of electron transfer by amino acid replacement K362M in a proton channel of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, 37(9):3053–3061.
- Walker, J. W., Reid, G. P., McCray, J., and Trentham, D. R. (1988). Photolabile 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Phosphate Esters of Adenine Nucleotide Analogues. Synthesis and Mechanism of Photolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 110:7170–7177.
- Wang, J., Takahashi, S., Hosler, J. P., Mitchell, D. M., Ferguson-Miller, S., Gennis, R. B., and Rousseau, D. L. (1995). Two conformations of the catalytic site in the *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 34(31):9819–9825.
- Wang, K., Geren, L., Zhen, Y., Ma, L., Ferguson-Miller, S., Durham, B., and Millett, F. (2002). Mutants of the Cu_A site in cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: II. Rapid kinetic analysis of electron transfer. *Biochemistry*, 41(7):2298–2304.
- Wang, K., Mei, H., Geren, L., Miller, M. A., Saunders, A., Wang, X., Waldner, J. L., Pielak, G. J., Durham, B., and Millett et, a. (1996). Design of a ruthenium-Cytochrome *c* derivative to measure electron transfer to the radical cation and oxyferryl heme in Cytochrome *c* peroxidase. *Biochemistry*, 35(47):15107–15119.
- Weng, L. C. and Baker, G. M. (1991). Reaction of hydrogen peroxide with the rapid form of resting cytochrome oxidase. *Biochemistry*, 30(23):5727–5733.
- Westphal, K. L., Tommos, C., Cukier, R. I., and Babcock, G. T. (2000). Concerted hydrogen-atom abstraction in photosynthetic water oxidation. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3):236–242.
- Wieboldt, R., Gee, K., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B., and Hess, G. (1994a). Photolabile Precursors of Glutamate: Synthesis, Photochemical Properties, and Activation of Glutamate Receptors on a Microsecond Time Scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19):8752–8756.
- Wieboldt, R., Ramesh, D., Carpenter, B. K., and Hess, G. P. (1994b). Synthesis and photochemistry of photolabile derivatives of γ -aminobutyric acid for chemical kinetic investigations of the γ -aminobutyric acid receptor in the millisecond time region. *Biochemistry*, 33(6):1526–1533.
- Wikström, M. (1989). Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping. *Nature*, 338(6218):776–778.
- Wikström, M. (1998). Proton translocation by bacteriorhodopsin and heme-copper oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(4):480–488.
- Wikström, M. (2000). Mechanism of proton translocation by cytochrome *c* oxidase: a new four-stroke histidine cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1458(1):188–198.
- Wikström, M. (2004). Cytochrome *c* oxidase: 25 years of the elusive proton pump. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1655:241–247.
- Wikström, M., Krab, K., and Saraste, M. (1981). *Cytochrome Oxidase - A Synthesis*. Academic Press, London.

- Wikström, M., Ribacka, C., Molin, M., Laakkonen, L., Verkhovsky, M., and Puustinen, A. (2005). Gating of proton and water transfer in the respiratory enzyme cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:10478–10481.
- Wikström, M., Verkhovsky, M. I., and Hummer, G. (2003). Water-gated mechanism of proton translocation by cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1604(2):61–65.
- Williams, R. J. P. (2002). The problem of proton transfer in membranes. *Journal of Theoretical Biology*, 219(3):389–396.
- Wilson, D. F., Lindsay, J. G., and Brocklehurst, E. S. (1972). Heme-heme interaction in cytochrome oxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 256(2):277–286.
- Winkler, Jay R. & Gray, H. B. (1992). Electron transfer in Ruthenium-modified Proteins. *Chemical Reviews*, 92:369–379.
- Witt, S. and Chan, S. (1987). Evidence for a ferryl Fe_{a_3} in oxygenated cytochrome *c* oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(4):1446–1448.
- Witt, S. N., Blair, D. F., and Chan, S. I. (1986). Chemical and spectroscopic evidence for the formation of a ferryl Fe_{a_3} intermediate during turnover of cytochrome *c* oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(18):8104–8107.
- Wohlfahrt, G., Trivić, S., Zeremski, J., Peričin, D., and Leskovac, V. (2004). The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 260(1):69–83.
- Wrigglesworth, J. M. (1984). Formation and reduction of a 'peroxy' intermediate of cytochrome *c* oxidase by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 217(3):715–9.
- Wrigglesworth, J. M., Cooper, C. E., Sharpe, M. A., and Nicholls, P. (1990). The proteoliposomal steady state. Effect of size, capacitance and membrane permeability on cytochrome-oxidase-induced ion gradients. *The Biochemical Journal*, 270(1):109–118.
- Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997). Crystal Structure of the Cytochrome *bc*₁ Complex from Bovine Heart Mitochondria. *Science*, 277(5322):60–66.
- Xiao, K. H., Engstrom, G., Rajagukguk, S., Yu, C. A., Yu, L., Durham, B., and Millett, F. (2003). Effect of famoxadone on photoinduced electron transfer between the iron-sulfur center and Cytochrome *c*₁ in the cytochrome *bc*₁ complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13):11419–11426.
- Xu, J. and Voth, G. A. (2005). Chemical Theory and Computation Special Feature: Computer simulation of explicit proton translocation in cytochrome *c* oxidase: The D-pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(19):6795–6800.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G., and Iwata, S. (2003). Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science*, 299(5607):700–704.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T. (1998). Redox-Coupled Crystal Structural Changes in Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase. *Science*, 280(5370):1723–1729.

- Young, L. J. (1988). Conformational substates of bovine heart cytochrome *c* oxidase: the modified Volpe-Caughey variant. *Biochemistry*, 27(14):5115–5121.
- Yu, C.-A., Wen, X., Xiao, K., Xia, D., and Yu, L. (2002). Inter- and intra-molecular electron transfer in the cytochrome *bc*₁ complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1555(1-3):65–70.
- Yu, C. A., Yu, L., and King, T. E. (1972). Preparation and Properties of Cardiac Cytochrome *c*₁. *Journal of Biological Chemistry*, 247(4):1012–1019.
- Zaslavsky, D. and Gennis, R. B. (2000). Proton pumping by cytochrome oxidase: progress, problems and postulates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1458(1):164–179.
- Zaslavsky, D., Kaulen, A. D., Smirnova, I. A., Vygodina, T., and Konstantinov, A. A. (1993). Flash-induced membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase. *FEBS Letters*, 336(3):389–393.
- Zaslavsky, D., Sadoski, R. C., Wang, K., Durham, B., Gennis, R. B., and Millett, F. (1998). Single electron reduction of cytochrome *c* oxidase compound F: resolution of partial steps by transient spectroscopy. *Biochemistry*, 37(42):14910–14916.
- Zhang, L., Yu, L., and Yu, C.-A. (1998a). Generation of Superoxide Anion by Succinate-Cytochrome *c* Reductase from Bovine Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51):33972–33976.
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y.-I., Kim, K. K., Hung, L.-W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S.-H. (1998b). Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc*₁. *Nature*, 392(6677):677–684.
- Zheng, X., Medvedev, D. M., Swanson, J., and Stuchebrukhov, A. A. (2003). Computer simulation of water in cytochrome *c* oxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1557(1-3):99–107.
- Zhu, J., Egawa, T., Yeh, S.-R., Yu, L., and Yu, C. A. (2005). Fast Kinetic Studies of Mitochondrial Cytochrome *bc*₁ Complex. *Biophysical Journal*, 88:326a.
- Zundel, G. and Fritsch, J. (1986). *The Chemical Physics of Solvation*, volume 2. Elsevier, Amsterdam.

A. Anhang

A.1. Synthese des caged Fumarates

Die Synthesebeschreibung bezieht sich auf das Reaktionsschema in Abb. 3.20 auf S. 59. Bisher wurde eine chemische Analyse (MS, NMR, Elementaranalyse) nicht durchgeführt, sondern nur die funktionale Charakterisierung.

Darstellung von tert-Butyl-Ethylfumarat (Neises and Steglich, 1985) 7,2 g (0,05 mol) Ethylfumarat **1** werden zusammen mit 0,5 g (4 mmol) Dimethylaminopyridin und 11,1 g (0,15 mol) *tert*-Butanol in 40 ml Methylenchlorid in einem 100 ml Rundkolben (NS29) bei Raumtemperatur gelöst. Der Ansatz wird im Eisbad abgekühlt, anschließend werden 11,4 g (0,055 mol) Dicyclohexylcarbodiimid innerhalb von 5 min zugegeben und mit weiteren 10 ml Methylenchlorid aufgefüllt. Nach fünf Minuten auf Eis wird der Ansatz auf Raumtemperatur gebracht, und es wird drei Stunden unter Rühren inkubiert. Dabei bildet sich schnell ein dunkelbrauner Niederschlag.

Dieser wird über einem Büchnertrichter abgeschieden, und das Filtrat wird 2× mit je 25 ml 0,5 N HCl, danach mit 2× mit je 25 ml gesättigter Bicarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Der ölige Rückstand wird anschließend fraktionierend unter reduziertem Druck destilliert (Ausbeute 6,0 g (60 %); Lit. 76-80 %) .

Darstellung von tert-Butylfumarat (Denmark et al., 1996) Zu 4,0 g (2,5 mmol) *tert*-Butyl-Ethylfumarat in 100 ml Tetrahydrofuran werden 100 ml 0,2 N LiOH gegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt (Anderson and Callahan, 1960). Nach Zugabe von 47 ml Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) wird der Ansatz mit 2 N HCl auf pH 1 gebracht und mit weiteren 47 ml MTBE aufgefüllt. Anschließend wird die wässrige Phase 2× mit je 47 ml MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 42 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und danach über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der weiße Feststoff im Exsikkator getrocknet (Ausbeute 2,9 g (67 %); Lit. 93%).

Kopplung von CNB mit tert-Butylfumarat (Niu et al., 1996) In 10 ml Benzol werden 0,63 g (2 mmol) *tert*-Butyl- α -Bromo- α -(2-Nitrophenyl)acetat (das freundlicherweise von Dr. C. Grewer zur Verfügung gestellt wurde) und 0,34 g *tert*-Butylfumarat bei Raumtemperatur gelöst. Es werden 0,30 g (2 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en hinzugegeben, woraufhin sich die Lösung schnell lila verfärbt und mit der Zeit zunehmend ins Braune umschlägt. Der Ansatz wird über Nacht unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen wird der braune Niederschlag filtriert und vom Filtrat das Lösungsmittel abgezogen. Der braune, ölige Rückstand wird in wenig Methylenchlorid aufgenommen und auf eine Kieselgelsäule (Varian Bond Elut FL) mit Ethylessigsäure/Hexan (1:8) [v/v] chromatographiert. Die einzelnen Fraktionen werden aufgrund ihres UV-Spektrums und Dünnschichtchromatographie

(DC) gepoolt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und das Kopplungsprodukt **6**, (E)-But-2-endisäure-*tert*-butoxycarbonyl-(2-nitro-phenyl)-methylester- *tert*-butylester, getrocknet (Ausbeute 0,17 g (21 %)).

Caged Fumarat Die *tert*-Butyl-Schutzgruppen werden nun selektiv mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten. Das Kopplungsprodukt **6** wird in 1 ml Methylenchlorid gelöst. Es werden 1 ml TFA zugegeben und der Ansatz wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der Rückstand in 0,7 ml Methanol gelöst. Das Produkt wird über eine Sephadex LH20 Säule mit Methanol als Laufmittel gereinigt. Das Produkt wird über sein UV-Spektrum und DC identifiziert, die einzelnen Fraktionen gesammelt, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt im Exsikkator getrocknet (Ausbeute 91 mg (73 %)).

A.2. Synthese von Ru₂Q

Die Darstellung von Ru₂Q richtet sich im wesentlichen nach der Vorschrift von Downard et al. (1991) (siehe auch das Schema 3.29 auf S. ru2qsynth). Einige Abwandlungen und hilfreiche Vorschläge wurden freundlicherweise von Prof. Steels (University of Canterbury, Neuseeland) unterbreitet.

Darstellung von Bistriphenylphosphin-Nickel(II)-Dichlorid (Venantzi, 1958) Es werden 2,38 g (0,01 mol) Nickelchlorid in 20 ml Wasser gelöst und anschließend mit 50 ml Eisessig verdünnt. Zu diesem Ansatz werden 5,25 g (0,02 mol) Triphenylphosphin in 25 ml Eisessig zugetropft. Innerhalb von 24 h präzipitieren dunkelblaue Kristalle, die filtriert und mit Eisessig gewaschen werden (Ausbeute 84 %).

Darstellung von Bistriphenylphosphin-Nickel(II)-Dibromid (Venantzi, 1958; Iyoda et al., 1990) 5,45 g (0,02 mol) Nickelbromid und 10,49 g (0,04 mol) Triphenylphosphin werden in je 100 ml kochendem 1-Butanol gelöst und anschließend zusammengeführt. Bei Abkühlung auf Raumtemperatur entstehen Kristalle, die nach Filtration und Waschen mit 1-Butanol getrocknet werden (Ausbeute 72 %).

Darstellung von 4-Chloro-2,2'-Bipyridin (Moran et al., 1986) Zu 7,8 g (0,045 mol) Bipyridin-N-oxid werden 50 ml (0,535 mol) Phosphoroxychlorid langsam zugetropft (heftige Reaktion mit Verzug). Die braune Reaktionsmischung wird weitere 18 h unter Rückfluss gekocht (115° C). Nach Abkühlen wird der Ansatz im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wird mit Eiswasser versetzt und anschließend mit 5 N Natronlauge versetzt, bis der Ansatz alkalisch wird. Danach wird das Produkt mit 5×50 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird vereinigt und durch ein Bett aus Talkum (Magnesiumsilikat) filtriert. Nach Abzug des Lösungsmittels erhält man einen braunen Rückstand, der aus den beiden Isomeren 6-Chlorobipyridin und 4-Chlorobipyridin enthält (Ausbeute 50 %).

Zur Trennung der Isomeren nutzt man ihre unterschiedliche Fähigkeit zur Komplexierung zweiwertiger Ionen aus. Das braune Rohprodukt (6 g) wird in 20 ml Ethanol aufgenommen. Dazu gibt man 1,3 g NiCl₂ in 30 ml Wasser und kocht den Ansatz für fünf Stunden unter Rückfluss. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum abgezogen, und der Rückstand anschließend wieder in 50 ml Wasser aufgenommen. 6-Chlorobipyridin wird durch Extraktion

mit 3 × 50 ml gewonnen. Das gewünschte Isomer 4-Chloropyridin wird aus dem wässrigen Rückstand durch Zugabe von festem Kaliumcyanid (1 g) freigesetzt. Danach wird es ebenfalls mit 3 × 50 ml extrahiert. Von den jeweiligen Ansätzen wird das Lösungsmittel unter Vakuum destilliert. Anhand der ¹H-NMR Spektren lässt sich die Trennung anhand der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der H₃- und H₆-Protonen leicht verfolgen.

Analyse: 4-Chlorobipyridin ¹H-NMR (CDCl₃): 8,73 (d), H₆; 8,61 (d), H₆; 8,51 (d), H₃; 8,44 (d), H₃; 7,87 (d), H₄; 7,36 (m), H_{5,5}. 6-Chlorobipyridin ¹H-NMR (CDCl₃): 8,67 (ddd), H₆; 8,41 (d), H₃; 8,35 (dd) H₃; 7,82 (d), H₄; 7,77 (t) H₄; 7,35 (m) H₅; 7,32 (m), H₅.

Darstellung von 2,2':4',4'':2'',2'''-Quaterpyridin (Iyoda et al., 1990) Zu einer Lösung aus 3,68 g (3,6 mmol) Bistriphenylphosphin-Nickel(II)-Dibromid und 2,7 g (10 mmol) Triphenyl-phosphin in 25 ml Dimethylformamid werden 0,34 g (5 mmol) Zinkpulver gegeben. Die Lösung wird unter Argon gerührt, bis die Farbe nach rosa umschlägt. Daraufhin werden 0,98 g (5,2 mmol) 4-Chlorobipyridin beigemischt, und die Suspension wird weitere 40 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Von dem grünen Ansatz wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen und zum Kochen erhitzt, bis sich ein weißer Niederschlag aus Triphenylphosphinoxid bildet, der abfiltriert wird. Das Filtrat wird mit wässrigem Ammoniumhexafluorophosphat titriert, bis sich ein gelblicher Niederschlag bildet. Der Feststoff wird in wenig wässrigem Acetonitril (1:2, 30 ml) aufgenommen und unter Rückfluss mit 0,4 g Kaliumcyanid erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird Wasser hinzugegeben, bis ein gelber Niederschlag ausfällt. Das Filtrat wurde erneut mit Cyanid extrahiert. Die vereinigten Fraktionen wurden aus Chloroform/Methanol umkristallisiert (Ausbeute 30 %).

Analyse: 2,2':4',4'':2'',2'''-Quaterpyridin ¹H-NMR (CDCl₃): 8,82 (d), H₆; 8,81 (s), H₃; 8,73 (ddd), H₆; 8,48 (d), H₃; 7,85 (dd), H₄; 7,71 (d) H₅; 7,36 (ddd), H₅.

Bisbipyridyl-Ruthenium(II)-Dichlorid (Sullivan et al., 1978) In 20 ml Dimethylformamid werden 2,6 g (10 mmol) Rutheniumtrichlorid (Trihydrat), 3,12 g (20 mmol) Bipyridin und 2,8 g (60 mmol) Lithiumchlorid für acht Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden 250 ml Aceton zugegeben und mit Eis weiter abgekühlt. Die dunkelrote Flüssigkeit wird filtriert und das dunkelgrüne Präzipitat gesammelt. Der Feststoff wird mit Wasser und Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet (Ausbeute 70 %).

Darstellung von [Bis-(2,2')-Bipyridyl-(2,2'4',4''2'',2''')-Quaterpyridin-Ruthenium-(II)]-Tetrahexafluorophosphat (Steel and Constable, 1990) Bisbipyridyl-Ruthenium(II)-Dichlorid (1,56 g; 3,2 mmol) wird eine Stunde in einem Ethanol/Wasser-Gemisch (3:1) unter Rückfluss gekocht. Darauf wird der Ligand Quaterpyridin (0,5 g; 1,6 mmol) zugegeben und der Ansatz weitere sechs Stunden unter Rückfluss gekocht. Der Ansatz wird auf Raumtemperatur gebracht und filtriert. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen und das Produkt durch Einführung von Ammoniumhexafluorophosphat gefällt. Nach Filtration wird das Rohprodukt in Acetonitril aufgenommen und durch langsames Einführen in Diethylether erneut gefällt (Ausbeute 65 %).

Analyse: Elementaranalyse C₆₀H₄₆F₂₄N₁₂P₄Ru₂. *berechnet* C 41,97 %, H 2,70 %, N 9,79 %. *gefunden* C 41,49 %, H 2,98 %, N 9,29 %. *m/z* (%): [Ru₂Q (PF₆)₂]²⁺ 713,46 (100);

$([\text{Ru}_2\text{Q}(\text{PF}_6)_2]^{2+}\text{-e}^-)$ 476,2 (3,4); $[\text{Ru}_2\text{Q}(\text{PF}_6)]^{3+}$ 427,25 (63,01); $([\text{Ru}_2\text{Q}(\text{PF})_6]^{2+})\text{+e}^-$ 641,01 (4,0); $([\text{Ru}_2\text{Q}]^{4+})\text{+e}^-$ 378,59 (44,3); $([\text{Ru}_2\text{Q}]^{4+})\text{+2 e}^-$ 568,64 (1,6).

A.3. Synthese von $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ und $\text{Ru}_{\text{bpz}}\text{-H39C-Cc}$

Die Synthese richtet sich im Wesentlichen nach der Vorschrift in Engstrom et al. (2003). Die Nummern der einzelnen Zwischenstufen beziehen sich auf das Reaktionsschema in Abbildung 3.32 auf S. 72.

Darstellung von 4-Formyl-4'-Methyl-2,2'-Bipyridin 2 (Geren et al., 1991) Vier Gramm (0,022 mol) 4,4'-Dimethyl-2,2'-Bipyridin **1** werden in 200 ml Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 4 g Selendioxid (0,036 mol) wird die Lösung für 36 h unter Rückfluss erhitzt. Die gelbe Lösung wird filtriert, um den schwarzen Niederschlag zu entfernen. Danach wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Der schwarze Niederschlag, Selennebenprodukte, wird durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel verdampft. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis sich kein schwarzer Niederschlag mehr bildet (2-3 Mal; Ausbeute 85%).

Analyse: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): CH_3 2,45 ppm; CHO 10,19 ppm; aromatische 7,16-8,98.

Darstellung von 4-Hydroxy-4'-Methyl-2,2'-Bipyridin 3 (Geren et al., 1991) Drei Gramm (0,016 mol) 4-Formyl-4'-Methyl-2,2'-Bipyridin **2** werden in 30 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 0,6 g (0,016 mol) Natriumborhydrid, die zuvor in 5 ml 0,2 N Natronlauge gelöst wurden, in den Ansatz unter Eiskühlung zugetropft. Das Gemisch wird auf Raumtemperatur gebracht und noch für eine weitere Stunde gerührt. Nach Filtration des schwarzen Niederschlages und Abzug des Methanols werden 10 ml gesättigte Natriumcarbonatlösung hinzugefügt. Das Produkt wird mit 3×10 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt (Ausbeute 45 %).

Analyse: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): CH_3 2,43 ppm; CH_2OH 4,78 ppm; aromatische 7,13-8,60 ppm.

Darstellung von 4-Hydroxymethyl-4'-Methyl-2,2'-Bipyridin-Ruthenium(II)-Tetrachlorid 4 (Krause, 1977) Zu einer 1 N Salzsäurelösung (30 ml) gibt man 2,06 g (0,010 mol) RuCl_3 und 2,4 g (0,012 mol) 4-Hydroxy-4'-Methyl-2,2'-Bipyridin **3** und rührt, bis sich die Feststoffe gelöst haben. Danach wird das Reaktionsgefäß verschlossen, und man lässt den Ansatz für 21 Tage im Dunkeln stehen. Das Rohprodukt wird filtriert und mit Wasser gewaschen. Anschließend wird es über P_4O_{10} im Vakuum getrocknet (Ausbeute 80 %).

Darstellung von 2,2'-Bipyrazin 6 (Rillema et al., 1983) 6,25 g (0,050 mol) von Pyrazincarbonsäure **5** werden in 200 ml Ammoniak (15 M) gelöst. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der Rückstand in 250 ml einer gesättigten Kupfer(II)-Acetat-Lösung aufgenommen. Der Ansatz wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und der blaue Niederschlag anschließend durch Filtration gewonnen. Nach Waschen mit Ethanol und Diethylether wird der Feststoff getrocknet. Der Feststoff wird in Portionen von 2,5 g sublimiert ($\approx 280^\circ \text{C}$). Hierbei scheidet sich das gewünschte Produkt am unteren Ende, das Nebenprodukt Pyrazin am oberen Ende der Sublimationsapparatur ab. Das Rohprodukt wird gesammelt und

aus Diethylether umkristallisiert (Ausbeute 10%).

Analyse $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 8,68 (s); 9,63 (s).

Darstellung von [(2,2'-Bisbipyrazin-4-Hydroxymethyl-4'-Methyl-(2,2')-Bipyridin-Ruthenium(II)]-Bishexafluorophosphat (Rillema et al., 1983) 0,47 g (1 mmol) 4-Hydroxymethyl-4'-Methyl-2,2'-Bipyridin-Ruthenium(II)-Tetrachlorid **4** und 0,37 g (2,34 mmol) Bipyrazin werden in 25 ml Ethylenglykol gelöst und für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird auf Raumtemperatur gebracht und der Rutheniumkomplex mit einer gesättigten Kaliumhexafluorophosphat-Lösung gefällt. Nach Zugabe von 25 ml Wasser wird das Präzipitat abfiltriert. Nach Aufnahme in Acetonitril wird das Produkt erneut durch Einführen in Diethylether gefällt, filtriert und mit Ether gewaschen. Anschließend wird das Produkt im Vakuum getrocknet (Ausbeute 75 %).

Darstellung von $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ **8 (Geren et al., 1991)** Nach Zugabe von 0,5 g (0,55 mmol) von **7** zu 10 ml HBr und 1 ml Schwefelsäure (98 %) wird der Ansatz für 3 h unter Rückfluss gekocht. Danach wird der Ansatz auf Raumtemperatur gekühlt und das Produkt mit Ammoniumhexafluorophosphat gefällt. Das Präzipitat wird filtriert und mit Diethylether gewaschen, anschließend unter Vakuum getrocknet (Ausbeute 40 %).

Analyse: $^1\text{H-NMR}$ (MeOD): CH_3 2,52 ; CH_2Br 4,63; arom. 7,3-9,8. m/z (%): $[\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}]^{2+}$ 339,8 (61,4); $([\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}]^{2+}-\text{e}^-)$ 178,0 (100).

Kopplung von $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ mit H39C;C102T Cytochrom c aus Hefe (Engstrom et al., 2003) Die Mutante H39C;C102T Cytochrom *c* wurde von Dr. Tina Wenz (MPI für Biophysik) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ungefähr 500 μM Cytochrom *c* werden mit 260 μM Dithiothreitol in 50 mM Kaliumborat (pH 9,0) versetzt, um eventuell entstandene Dimere über die Disulfidbindung zu lösen. Der Ansatz wird unter Stickstoff für 30 min inkubiert. Darauf werden 1,8 mM $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ zugefügt und der Reaktionsansatz für drei Stunden bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wird überschüssiges $\text{Ru}(\text{bpz})_2\text{dmbpy}$ durch Konzentratoren und anschließende Dialyse vom markierten Cytochrom *c* getrennt.

Danksagung

Ohne die zahlreiche Mithilfe und die viele Unterstützung hätte die hier vorliegende Doktorarbeit nicht Realität werden können. Bedanken möchte ich mich. . .

- . . . bei Prof. Klaus Fendler für die Betreuung und freundliche Unterstützung.
- . . . bei Prof. Ernst Bamberg für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine Unterstützung bei der Durchführung der Promotion.
- . . . bei Prof. Bernd Ludwig für die interessanten Diskussionen und die Bereitstellung von Protein.
- . . . bei Prof. Hartmut Michel für die vielen Anregungen, sowie seiner Gruppe – Kerstin Budiman, Kristina Kirchberg, Hanne Müller und Heike Angerer – für viele Tipps und Proteinlieferungen.
- . . . bei Dr. Ernst Grell für seine Hilfe in Oxidasefragen und der Aufreinigung einer chloridfreien Oxidase.
- . . . bei Prof. Ulrich Brandt für das Überlassen einer chloridfreien Rinderherzoxidase.
- . . . bei Dr. Tewfik Soulimane für das Überlassen der *ba₃*-Oxidase aus *Thermus thermophilus*.
- . . . bei Prof. Peter Rich für Diskussionen und seine Hilfe bei den Messungen zur Heterogenität der Oxidase.
- . . . bei PD Roy Lancaster für die Zusammenarbeit bei der QFR. Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Mauro Mileni bedanken für die schöne Zusammenarbeit und sein unermüdliches Interesse in QFR-Fragen. Ebenso danke ich Dr. Alex Haas bei der Hilfe mit FT-IR Messungen am *caged* Fumarat.
- . . . bei Dr. Carola Hunte für die Kooperation am *bc₁*-Komplex. Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Tina Wenz für die Aufreinigung des *bc₁*-Komplexes und die vielen hilfreichen Tipps.
- . . . bei Prof. Steel für Tipps zur Synthese des dimeren Rutheniumkomplexes.
- . . . bei Prof. Schwalbe für die Benutzung der chemische Laboratorien bei den Synthesen. Ganz herzlich möchte ich mich bei Jürgen Graf für seine Hilfe und Tipps bei den Synthesen bedanken.
- . . . bei Patrick Schulz und Julia Spitz für einige Messungen an der Oxidase.
- . . . bei allen Mitgliedern der Abteilung Biophysikalische Chemie für die immer herzliche und freundliche Atmosphäre.
- . . . bei meiner Familie für die lange Unterstützung.
- . . . bei Andi, Tobi und Christian für den freundschaftlichen Trost.
- . . . bei Rike, dass sie mich immer unterstützt, aufgebaut und daran erinnert hat, was wirklich wichtig ist . . .

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Bamann
Geburtsdatum: 16.04.1975
Geburtsort: Tübingen
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulausbildung

1981-1985 Grundschole Dettenhausen
1985-1992 Uhland-Gymnasium Tübingen
1992-1994 Heinrich-Suso-Gymnasium Konstanz

Studium

1995-2001 Studium der Biochemie an der Universität Regensburg
1998-1999 Auslandsstipendiat an der Washington-University in St. Louis, USA, Laboraufenthalt mit Arbeiten an Zink substituiertem Hämoglobin bei Prof. Dr. Gary Ackers
Abschluss Diplom-Biochemiker
Diplomarbeit am Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie bei Prof. Dr. Dr. Kalbitzer, betreut durch Prof. Dr. Eike Brunner
Thema Hochtemperaturstruktur des Kälteschockproteins aus *Thermotoga maritima*
seit 07-2001 Promotion am Max-Planck-Institut für Biophysik, Abteilung Biophysikalische Chemie